

Infectiologie

3e édition

Pharmacie - Biologie :
- Concours de l'Internat
- Formation continue

Collection dirigée par
Michel VAUBOURDOLLE

COLLECTION
LE MONITEUR
INTERNAT

Tome 3

Infectiologie

3e édition

Collection dirigée par

Michel VAUBOURDOLLE







1, rue Eugène et Armand Peugeot
92856 Rueil-Malmaison cedex
ISBN : 978-2-915585-40-7

Avant-propos

Le Moniteur Internat est devenu pour les étudiants en Pharmacie qui souhaitent passer le Concours de l'Internat en Pharmacie un outil de référence comportant les connaissances essentielles, accompagnées d'applications pratiques. C'est également pour les pharmaciens et les biologistes une base de formation continue rassemblant l'essentiel des disciplines pharmaceutiques.

Pour continuer la double action qui actualise l'ensemble des disciplines de la biologie et de la pharmacie et qui permet aux étudiants de disposer d'un outil performant, nous avons rassemblé l'ensemble des questions figurant au programme de l'Internat en Pharmacie dans quatre volumes.
Ces ouvrages constituent la troisième édition de la collection du Moniteur Internat. La rubrique « Vérifiez vos connaissances », qui comprend notamment des QCM et des cas cliniques, a été actualisée, enrichie et sera prochainement disponible en ligne sur www.WK-pharma.fr.

Le premier tome, « Toxicologie, Sciences Mathématiques, Physiques et Chimiques », regroupe l'essentiel des questions fondamentales ou analytiques ainsi que la Toxicologie.
Le deuxième tome, centré sur la Biologie, comporte la Biochimie et l'Hématologie.
La Biologie et la Pharmacie se retrouvent dans le troisième tome, consacré à l'Infectiologie : celui-ci rassemble les questions d'Immunologie, de Bactériologie, de Virologie, de Mycologie, de Parasitologie, d'Hygiène et de Prévention ainsi que les médicaments associés.
Enfin, le quatrième et dernier tome est ciblé sur le Médicament au sens le plus général : Physiologie, Pharmacologie, Pharmacie Clinique.

Dr Michel VAUBOURDOLLE
Biologiste des Hôpitaux
Directeur de Collection

Comité éditorial

Préface

Ce volume traite des maladies infectieuses les plus courantes, de leur diagnostic biologique et de leurs traitements préventifs et curatifs.

Il est destiné à aider les étudiants préparant le concours de l'internat en pharmacie en faisant une synthèse de l'enseignement portant sur la microbiologie, l'immunologie, sous forme de chapitres reprenant les grands thèmes du programme de l'internat en particulier la section IV traitant des infections bactériennes, virales et parasitaires et la section V portant sur les traitements de ces infections. Il permettra aux étudiants de trouver l'information indispensable pour répondre aux QCM et aux questions des dossiers biologiques et thérapeutiques.

Il a été actualisé afin de tenir compte de l'évolution des connaissances sur les micro-organismes et leur génome. Ainsi, la connaissance des génomes est à l'origine de méthodes diagnostiques nouvelles fondées sur la détection des gènes par différentes techniques moléculaires. Les résistances des agents infectieux aux anti-infectieux ainsi que les méthodes pour leur détection sont aussi actualisées, bien qu'en perpétuelle évolution étant donné les capacités d'adaptation des micro-organismes sous la pression des traitements anti-infectieux.

Ainsi, les lecteurs bénéficieront de données récentes concernant l'épidémiologie des maladies infectieuses, les agents infectieux émergents, les nouveautés diagnostiques et thérapeutiques pour compléter ou mettre à jour leurs connaissances.

Nous tenons à remercier les collègues hospitaliers et universitaires qui ont participé à cet ouvrage et le directeur de cette collection sans qui cette réédition n'aurait pas vu le jour.

Pr Anne COLLIGNON
Laboratoire de Microbiologie
UFR de Pharmacie, Paris XI

Sommaire

Immunologie

Bactériologie

Virologie

Parasitologie Mycologie

Épidémiologie, prévention et hygiène

Médicaments



Immunologie

Les immunoglobulines

E. BALLOT, C. JOHANET
Laboratoire d'immunologie et d'hématologie biologiques,
hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris.

VII. Génétique de la structure des Ig

A. Gènes codant pour les chaînes lourdes
B. Gènes codant pour les chaînes légères
C. Transcription du gène réarrangé
D. Ig membranaires et Ig sécrétées
E. Synthèse simultanée des IgM et des IgD
F. Commutation des plasmocytes à IgM en plasmocytes synthétisant une autre classe d'IgG

VIII. Origine de la diversité des Ac

A. Diversité de la lignée germinale
B. Génération somatique de la diversité
C. Hypermutations somatiques

La difficulté réside dans le grand nombre de structures à décrire. L'origine de cette diversité repose sur un support génétique qui est abordé succinctement, bien que l'intitulé de la question soit structures et propriétés des immunoglobulines. Certaines notions seront répétées dans plusieurs paragraphes, sous des formes différentes.
L'injection à un animal d'une protéine étrangère permet d'obtenir un antisérum capable de réagir avec cette protéine appelée antigène (Ag). Cette reconnaissance peut se faire grâce à une glycoprotéine appelée immunoglobuline (Ig). Immunoglobuline est un terme générique où la spécificité pour l'Ag n'est pas supposée connue. Au contraire, le terme anticorps (Ac) désigne une Ig capable de réagir spécifiquement avec un Ag. Les Ac sont doués d'une capacité de reconnaissance spécifique par complémentarité de structure tridimensionnelle entre l'épitope, ou déterminant antigénique, et sa structure complémentaire sur l'Ac, le paratope.
Bien que dotée de structure analogue, la famille des Ig est d'une extrême diversité structurale et remplit de nombreuses fonctions. Une Ig possède en effet 2 propriétés assurées par des domaines distincts de la molécule :
- *liaison spécifique à un ou plusieurs ligands ;*
- *fonction effectrice comme la fixation du complément, la traversée de certains épithéliums, la traversée du placenta, la fixation à des récepteurs cellulaires.*

Mais les Ig se comportent aussi comme des Ag. Elles donnent naissance à des Ac dirigés contre des déterminants antigéniques portés par ces Ig.

I. Structure générale des Ac

Malgré leur grande diversité, les Ig présentent une structure générale voisine. Elles sont composées de 2 chaînes lourdes (H : *heavy*) et 2 chaînes légères (L : *light*) identiques deux à deux et réunies par des ponts disulfures interchaînes. Chaque chaîne présente plusieurs domaines de 110 acides aminés environ centrés par un pont disulfure. Ce sont des glycoprotéines (2 % à 14 % de sucres selon le type d'Ig).

A. Structure primaire

Elle a été en partie élucidée par des protéolyses partielles enzymatiques ou chimiques et par des réductions douces des ponts disulfures.
Ainsi, l'action d'agent réducteur des ponts disulfures, suivie d'une alkylation pour éviter la reformation de ces ponts, génère 2 types de chaînes différentes, de masse moléculaire 50 kDa et 25 kDa pour une IgG. La masse moléculaire d'une IgG étant de 150 kDa, on peut postuler que la molécule native est constituée de 2 chaînes lourdes et 2 légères assemblées par des ponts disulfures.
Après action de la papaïne (*fig. 1*), 2 fragments identiques appelés Fab (*fragment antigen binding*) sont générés ainsi qu'un fragment cristallisable en solution aqueuse appelé Fc. Les fragments Fab conservent l'activité de liaison à l'Ag mais sont univalents, ils ne possèdent qu'un site Ac. Les capacités agglutinantes sont perdues. Les fragments Fab représentent les 2/3 de la masse de la molécule originelle.
La pepsine (*fig. 1*) génère un grand fragment F(ab')2 et des petits peptides. Le fragment F(ab')2 se comporte pratiquement comme un Ac entier, il est divalent

(2 sites de combinaison à l'Ag) et est encore en partie agglutinant. Après réduction douce, ce fragment donne naissance à 2 fragments Fab' aux propriétés analogues au Fab.

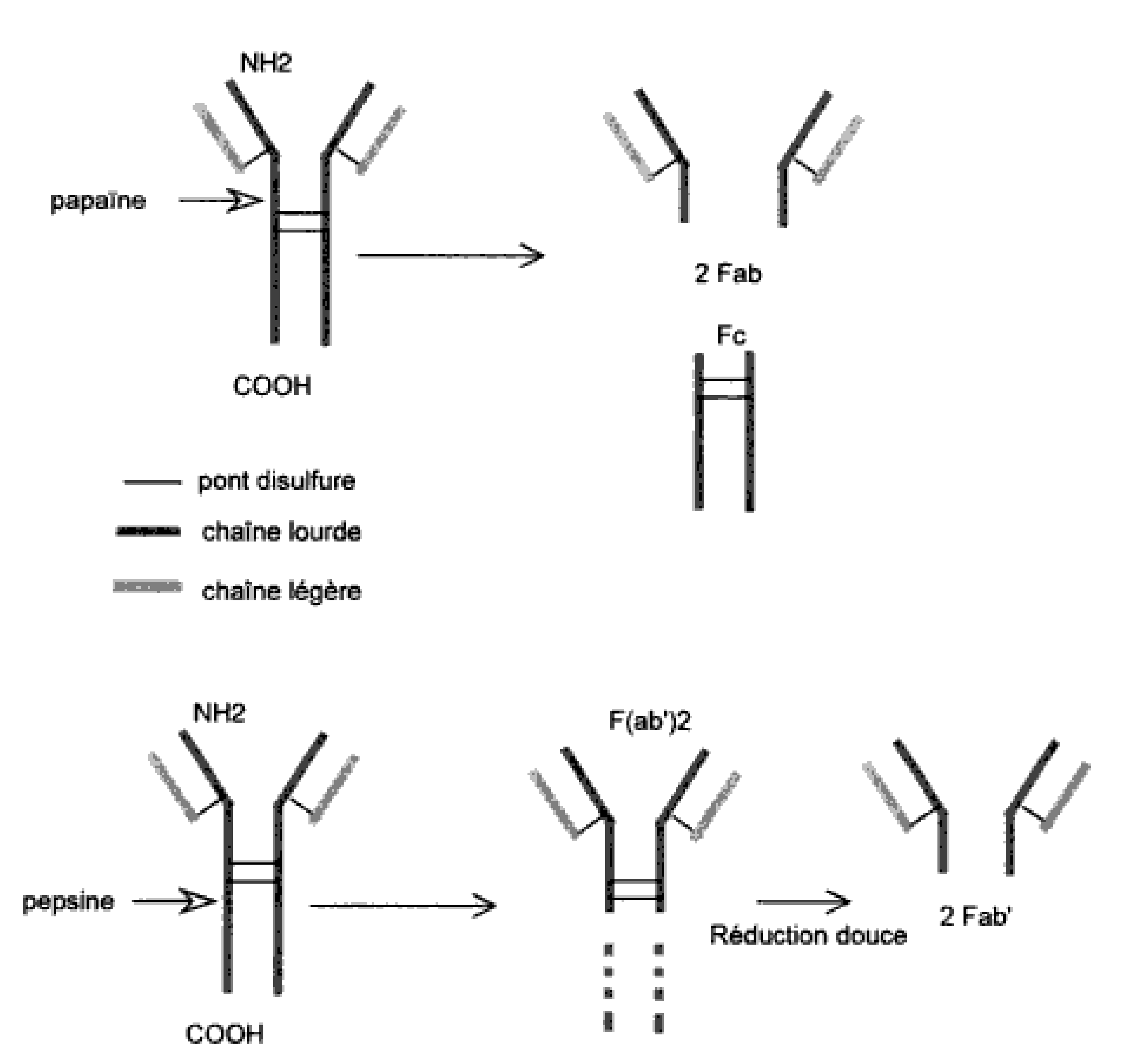


Figure 1. Effets de la papaïne et de la pepsine sur la molécule d'IgG

1. Structure primaire des chaînes légères L

Les chaînes L sont constituées de 211 à 217 acides aminés (aa). Leur masse moléculaire est d'environ 25 kDa. L'analyse de leur séquence permet d'en distinguer 2 types appelés κ et λ. Cependant, pour un type κ ou λ donné, la partie aminoterminale diffère de 10 à 30 % dans les 110 premières portions. On distingue donc (*fig.* 2) :

- une partie C constante d'une chaîne κ ou λ à une autre, située dans les 110 acides aminés de la partie carboxyterminale. Quelques différences peuvent cependant exister correspondant à des variations dites allotypiques.
- une partie V variable à l'extrémité aminoterminale, sa séquence en acides aminés varie d'une chaîne légère à une autre pour un même type κ ou λ et pour un même individu.

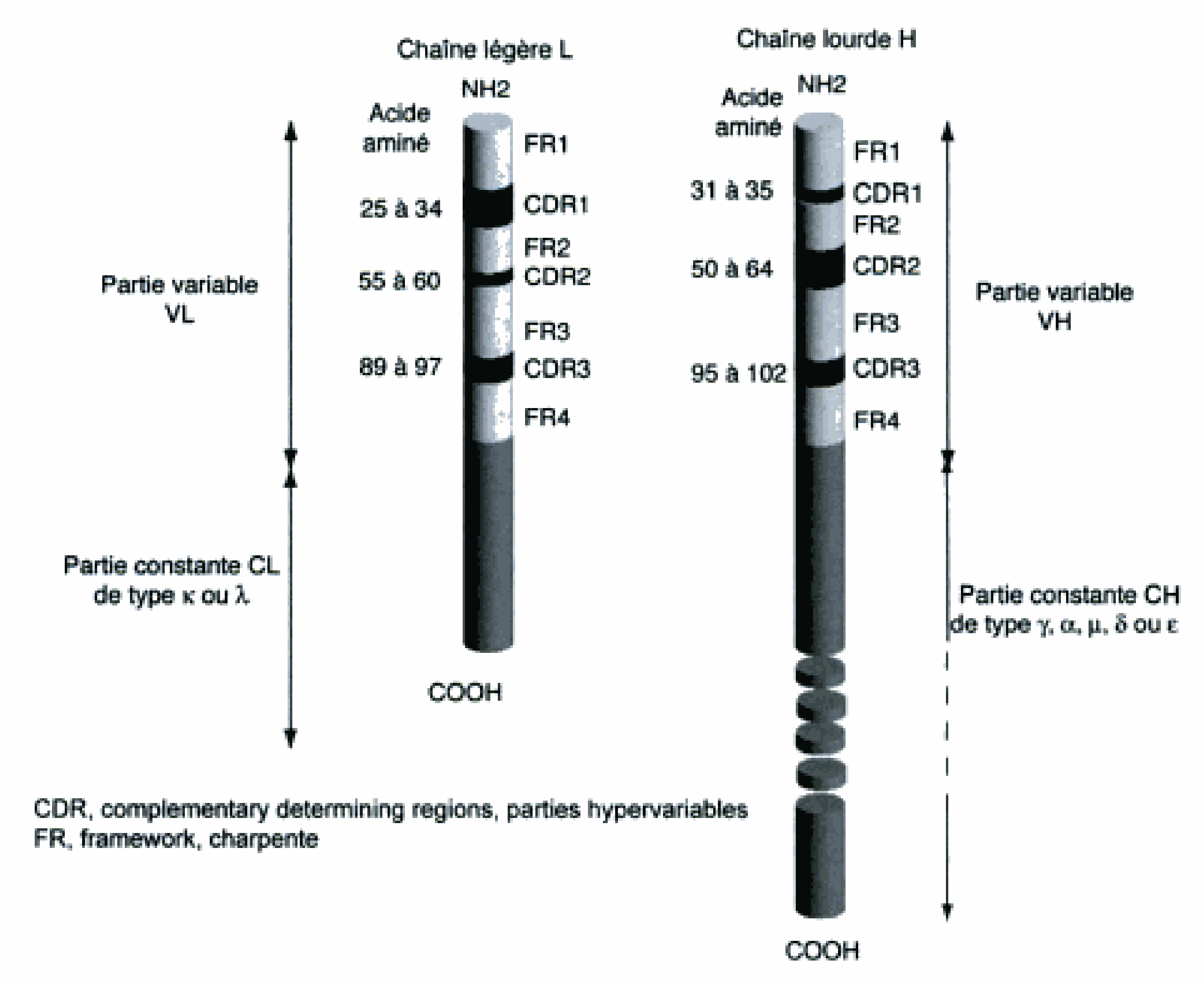


Figure 2. Structure primaire des Ig, parties constantes et variables des chaînes légères et lourdes

De plus, la comparaison des séquences d'un grand nombre de chaînes légères d'un même type montre que la variabilité de cette partie n'est pas linéairement répartie de façon homogène. De courts segments présentent une extrême variabilité et sont qualifiés de régions hypervariables ou CDR (*complementary determing region*). Il y en a trois. Les 3 CDR, de 5 à 10 acides aminés chacune, correspondent aux zones de contact entre la chaîne légère de l'Ac et le déterminant antigénique correspondant.

Les tronçons entre ces parties variables sont relativement bien conservés d'une molécule à l'autre et constituent l'armature de cette partie variable. Ils sont appelés FR ou *framework* (charpente). Il y en a 4. Les 4 FR permettent le classement des chaînes légères en sous-groupes de variabilité, fonction des homologies de leur séquence.

La chaîne légère est commune à toutes les classes. Chaque type κ ou λ peut se combiner avec n'importe quel type de chaîne lourde, mais une Ig a 2 chaînes légères de même type. Une molécule hybride avec une chaîne κ et une chaîne λ n'existe pas.

Chez l'homme, 60 % des chaînes légères sont de type κ.

2. Structure primaire des chaînes lourdes H

L'analyse des séquences des chaînes lourdes permet d'individualiser 5 types (α, γ, μ, δ et ε) auxquels correspondent les 5 classes d'Ig (IgA, IgG, IgM, IgD et IgE). Les homologies de séquence entre chaque classe sont d'environ 40 %.
Un niveau d'analyse plus poussée fait apparaître 4 sous-types de chaînes γ (γ1 à γ4) et 2 sous-types de chaînes α (α1 et α2) où les homologies entre les séquences de chaque sous-type atteignent 80 %.
Selon la classe, les chaînes lourdes comprennent de 440 à 550 acides aminés environ qui se subdivisent en 2 fragments (*fig.* 2) :

- un segment constant (CH : *constant heavy*) à l'extrémité carboxyterminale. Il représente les 3/4 de la chaîne lourde et possède hormis quelques variations (allotypiques) une structure constante pour une classe et sous-classe donnée. Cette portion porte des déterminants antigéniques qui définissent l'isotypie et l'allotypie de la chaîne lourde. Elle porte les fonctions effectrices de l'Ig ;
- un segment variable (VH : *variable heavy*) à l'extrémité aminoterminale. Il représente 1/4 de la chaîne lourde. Comme pour la chaîne légère, il existe des tronçons bien conservés et d'autres d'une extrême variabilité pour un type et sous-type donné, correspondant à 3 CDR et 4 FR.

Avec son homologue de la chaîne légère LH, le segment VH participe à la constitution du site anticorps.

B. Structures secondaire et tertiaire des Ig

Chaque chaîne d'Ig comporte des ponts disulfures intrachaînes en nombre variable selon la classe. Chaque pont intrachaîne entre 2 cystéines séparées de 60 positions (*fig.* 3) est au centre d'une portion polypeptidique appelée domaine. Chaque domaine d'environ 110 acides aminés forme 2 ensembles de feuillets β antiparallèles (l'un de 4 tronçons antiparallèles, l'autre de 3). Ces 2 ensembles de feuillets forment une structure tridimensionnelle cylindrique au cœur hydrophobe. Chaque domaine est porteur d'au moins une fonction biologique. Les domaines présentent de grandes homologies, c'est-à-dire qu'un nombre important parmi les 110 acides aminés qui constituent chacun d'entre eux est identique pour une position donnée.
Les régions constantes des chaînes lourdes s'organisent en plusieurs domaines de nombre variable selon les types et sous-types numérotés CH1 à CH4, CH1 faisant suite à la partie carboxyterminale de VH. La région constante de la chaîne légère correspond à un domaine.
Les régions variables lourdes et légères correspondent aussi à un domaine (*fig.* 4).

C. Structure quaternaire des Ig

Elle est assurée par les ponts disulfures interchaîne s.

1. Ponts disulfures entre chaînes lourdes

La zone où ils sont situés est riche en cystéine, mais aussi en proline, donnant au Fab son angulation. Cette zone est appelée région charnière, sa longueur (de 0 à 64 acides aminés) varie d'une chaîne lourde à l'autre. Le nombre de ponts disulfures

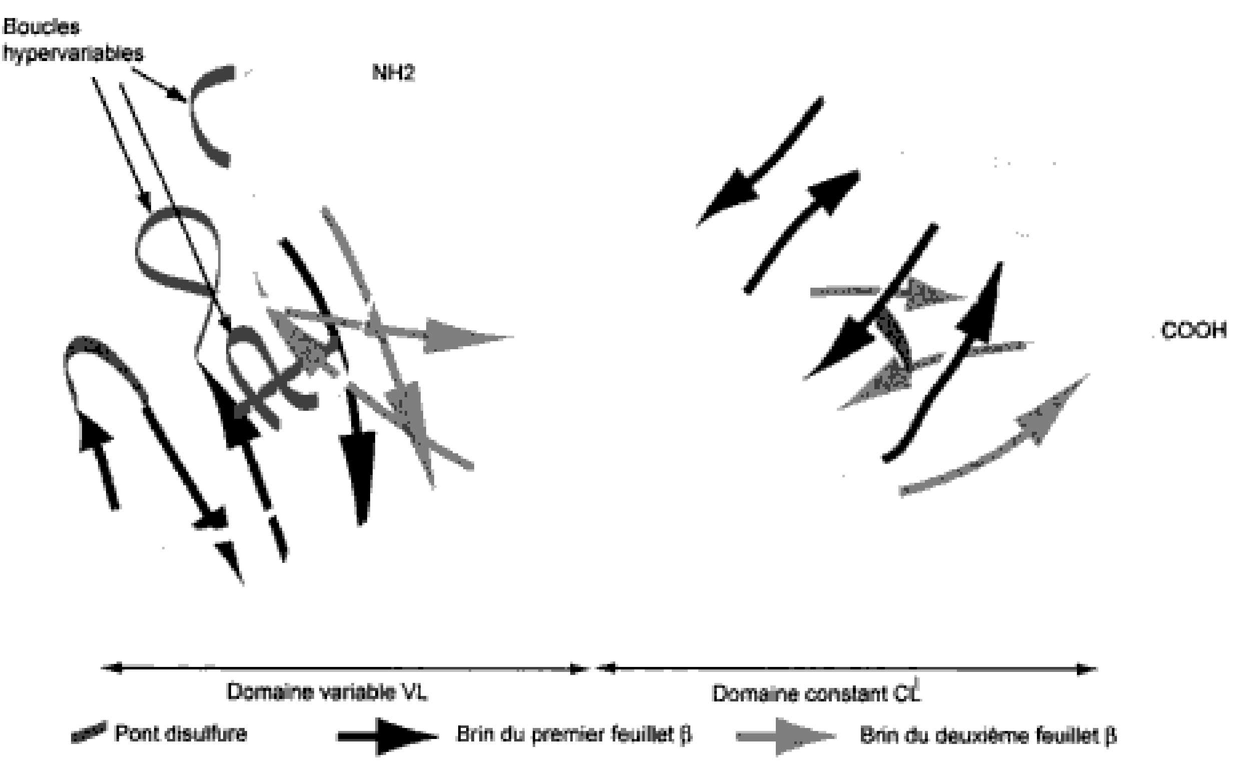


Figure 3. Organisation de la chaîne légère en domaines constants et variables, chacun composé de deux feuillets β, l'un de 3 brins et l'autre de 4

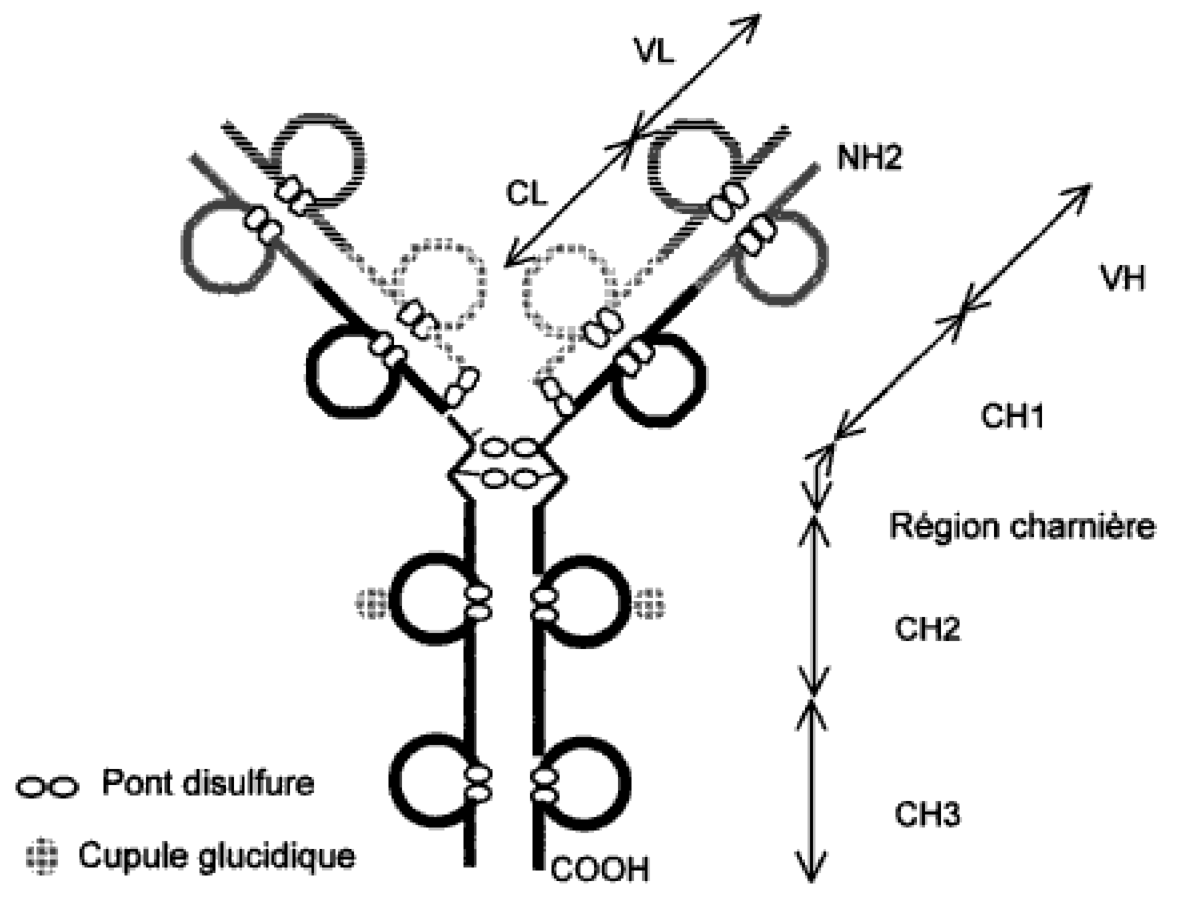


Figure 4. Organisation d'une Ig en domaines constants des chaînes lourdes (CH) et légères (CL) et en domaines variables des chaînes lourdes (VH) et légères (VL). Chaque domaine englobe environ 110 acides aminés, centrés par un pont disulfure entre 2 cystéines distantes d'environ 60 positions. Des ponts disulfures interchaînes assurent la cohésion de l'ensemble. Modèle de l'IgG1

dépend également du type de chaîne lourde. La région charnière est comprise entre CH1 et CH2. Les Ig avec les chaînes les plus étendues sont celles où la chaîne H est la plus flexible et la plus mobile. La flexibilité de cette région charnière augmente l'efficacité de la fixation de l'Ag en permettant de varier la distance entre les sites de combinaison avec l'Ag, d'où une meilleure adaptation structurale entre site Ac et déterminant antigénique.

2. Ponts disulfures entre chaînes lourde et légère

Un pont disulfure assure la liaison entre le domaine constant de la chaîne légère et le premier domaine constant de la chaîne lourde (*fig.* 4).

D. Glycosylation des Ig

Toutes les chaînes H contiennent au moins une chaîne oligosaccharidique, liée par liaison covalente, de type N-β glycosidique ou O-β glycosidique. Les chaînes L ne sont pas glycosylées. La masse de la cupule glucidique n'est pas négligeable et peut représenter une part importante de la masse moléculaire de l'Ig (2 à 14 %). La glycosylation est variable selon les classes d'Ig. Les sucres ne sont pas spécifiques d'un type d'Ig.

E. Site Ac des Ig

Les domaines VH et VL participent à la constitution du site Ac. Chacun de ces domaines est donc constitué de 2 feuillets β antiparallèles, centrés par un pont disulfure (l'un comporte 4 tronçons et l'autre 3).

Dans chaque domaine alternent 3 séquences d'une extrême variabilité (CDR) et 4 séquences relativement bien conservées (FR). Chaque tronçon de feuillet β est relié au suivant par des coudes qui forment des boucles correspondant aux parties hypervariables (*fig.* 3). Ce sont elles qui prennent contact avec l'Ag (*fig.* 5). 5 à 10 acides aminés de chaque région hypervariable forment le site de combinaison antigénique. Un paratope comprend donc 6 CDR (3 sur chaque chaîne lourde et légère) correspondant en moyenne une cinquantaine d'acides aminés. On peut rappeler qu'un épitope est représenté par une dizaine d'acides aminés ou 4 à 5 sucres rigides, et que 3 à 4 points de contacts suffisent pour définir une interaction de surface. Par la variation de la longueur en acides aminés des boucles hypervariables et par la nature de ces acides aminés, on peut engendrer une grande diversité des sites de combinaison à l'Ag sans perturber la structure tridimensionnelle globale de la molécule d'Ac.

Les dimensions et formes des sites de liaisons de l'Ac dépendent donc de la conformation de ces boucles hypervariables, déterminée par la séquence des chaînes latérales des acides aminés de la boucle. Les petits ligands se fixent au fond des poches dessinées par ces boucles, alors que les plus gros se fixent à la surface des sites.

En définitive (*fig.* 5), le site de fixation à l'Ag est représenté par la combinaison des régions variables des chaînes légères et lourdes, suite de boucles hypervariables (CDR) assurant la liaison spécifique au déterminant antigénique, et de tronçons conservés (FR) servant de squelette rigide et assurant l'intégrité conformationnelle globale du domaine variable.

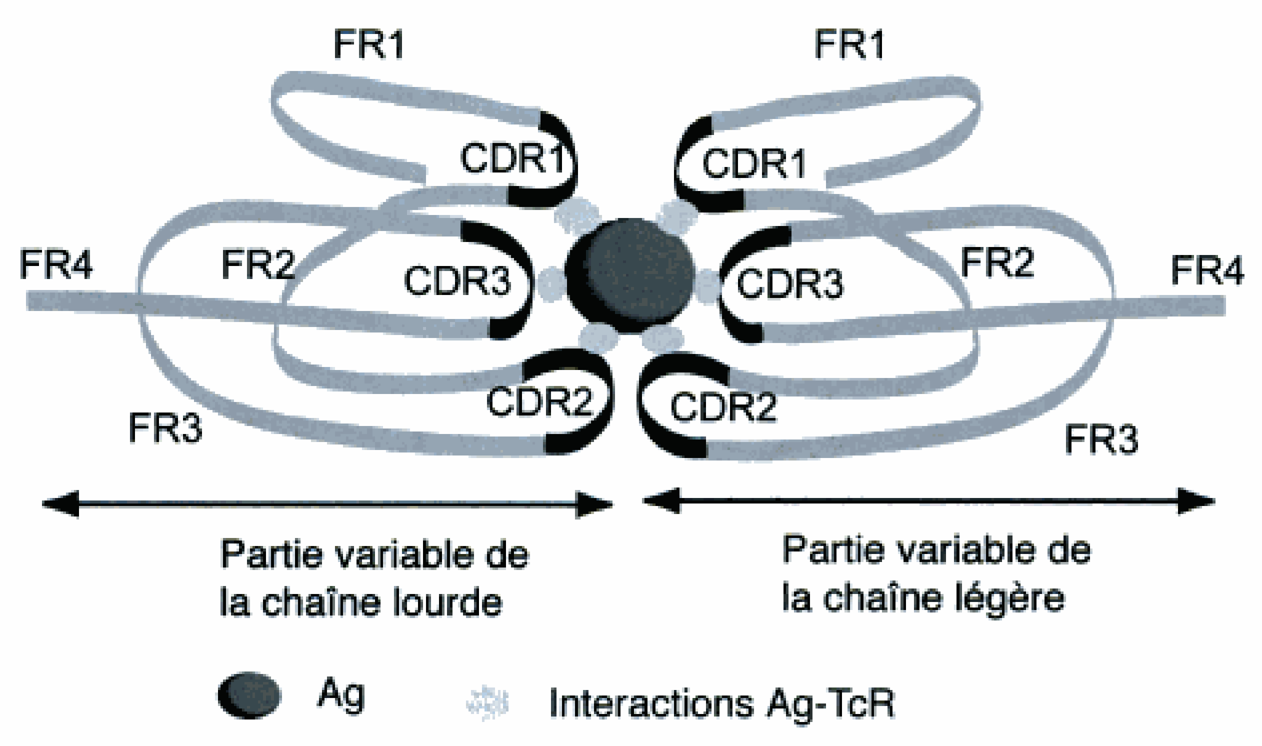


Figure 5. Site anticorps, interactions avec l'Ag

II. Caractéristiques de chaque classe d'Ac

Aux 5 types de chaînes lourdes γ, α, μ, δ et ε correspondent 5 classes (isotypes) d'Ig : IgG, IgA, IgM, IgD et IgE.

A. IgG

1. Caractéristiques biochimiques

- Ce sont des Ig majoritaires dans le sérum (85 %). Leur taux sérique est de 8 à 18 g/L ;
- Ce sont les plus petites, avec une masse moléculaire d'environ 150 kDa et un coefficient de sédimentation de 6,6 S ;
- Leur mobilité électrophorétique est de type γ et s'étend en β ;
- Elles sont peu glycosylées (3 %) ;
- Toutes les IgG sont monomériques ;
- En microscopie électronique, elles apparaissent sous forme d'un Y. Des différences de séquence en acides aminés des chaînes lourdes γ (avec au moins 80 % d'homologie) permettent de définir 4 sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 ;
- Les taux sériques des IgG1, 2, 3, et 4 sont respectivement d'environ 9, 3, 1 et 0,5 g/L. Les chaînes lourdes de chaque sous-classe présentent toutes de N vers C terminal un domaine variable Vγ, un domaine constant Cγ1, une région charnière et 2 autres domaines constants Cγ2 et Cγ3, l'ensemble comportant plus de 440 acides aminés.

2. Particularités structurales

La région charnière présente, selon la sous-classe considérée, un nombre variable d'acides aminés, de 12 à 62.
Le nombre de ponts disulfures échangés entre chaîne lourde et légère varie de 2 (IgG1 et IgG4), 4 (igG2) à 15 (IgG3) (*fig. 6*).

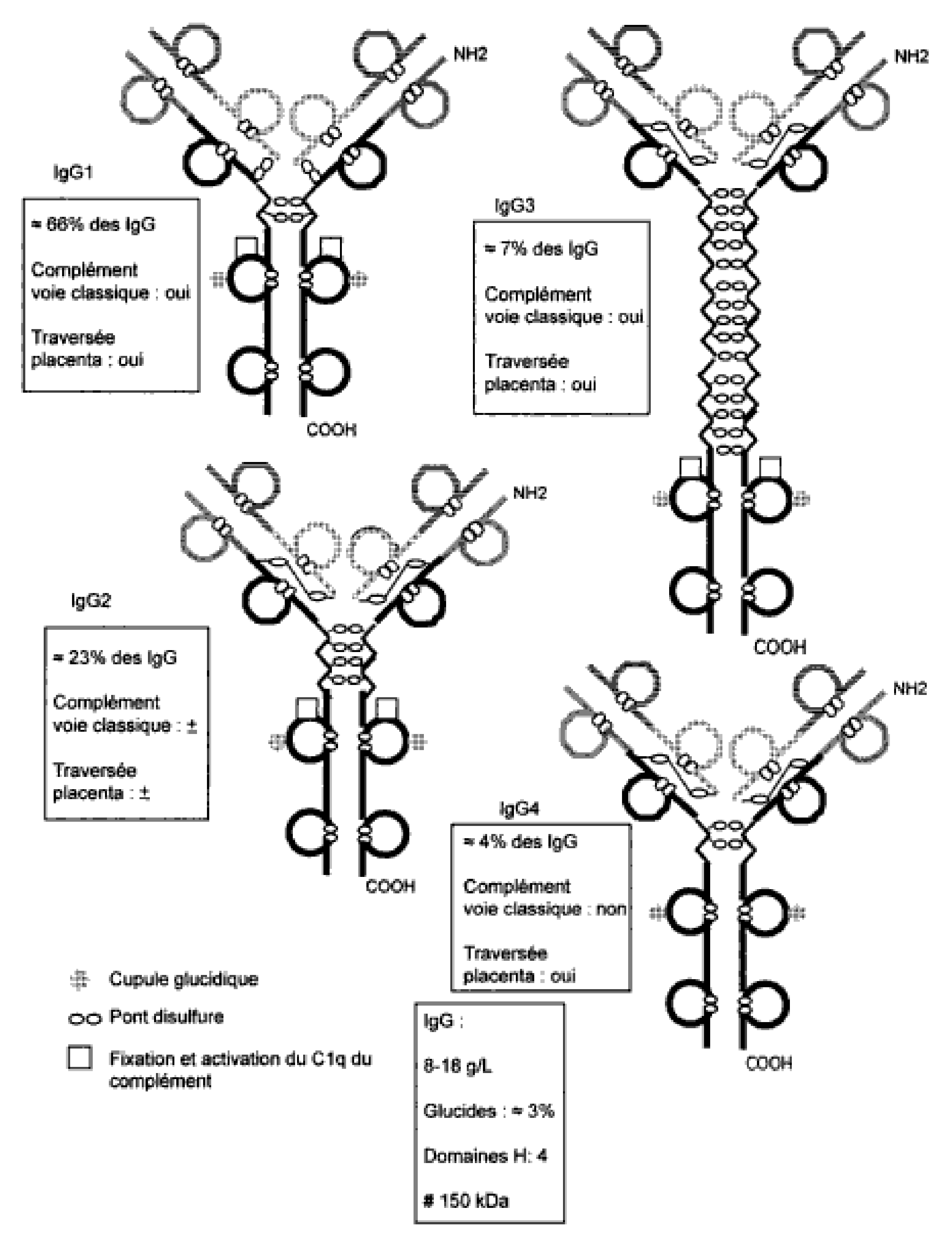


Figure 6. Organisation schématique des 4 sous-classes d'IgG humaines. Les différences structurales portent essentiellement sur les régions charnières, le nombre de ponts disulfures interchaînes lourdes et la localisation des ponts disulfures entre chaînes lourdes et légères

3. Propriétés

- Elles sont produites en grande quantité lors des réponses secondaires ;
- Fonctions effectrices dues au fragment Fc :
  - Activation de la voie classique du complément (sauf pour IgG4 et faible pour IgG2). Le Cγ2 contient le site de fixation au C1q,
  - Fixation à des récepteurs de surface par le Cγ3, avec une forte affinité sur les monocytes-macrophages, les polynucléaires neutrophiles (action de Cγ3 et Cγ1) et quelques lymphocytes T et B, et avec une faible affinité sur les éosinophiles, les plaquettes, les cellules endothéliales, les mastocytes, les cellules NK. Cette fixation des Ig à des récepteurs de surface par leur fragment Fc explique les phénomènes d'ADCC (*antibody dependent cellular toxicity*) et de phagocytose,
  - Ce sont les seuls Ac (IgG1, 3 et 4 surtout) à traverser le placenta par fixation sur le syncitiotrophoblaste. La fixation du fragment Fc (rôle des Cγ2 et Cγ3) aux récepteurs de ces cellules déclenche un mécanisme d'endocytose. Il y a ingestion des Ac fixés sur leurs récepteurs dans les vésicules d'endocytose, transfert vésiculaire à travers la cellule et libération des IgG par exocytose dans le sang fœtal,
  - Fixation à la protéine A du staphylocoque par le Cγ1 et Cγ3 des IgG1, 2 et 4 (propriétés utilisées pour la purification des IgG).

B. IgA

1. Caractères biochimiques

- Elles migrent avec les β globulines en électrophorèse ;
- Il en existe 2 sous-classes, IgA1 et IgA2 (2 sous-types de chaînes lourdes α1 et α2). Il existe 2 formes dites allotypiques de l'IgA2, A2m (1) et A2m (2) (les déterminants allotypiques sont des motifs antigéniques observés chez certains individus de l'espèce. Ils traduisent des différences entre chaque individu portant sur quelques acides aminés dans la structure primaire des régions constantes des Ig, pour une même classe et sous-classe) ;
- Elles sont présentes dans le sang et les sécrétions :
  - dans le sang, les IgA représentent quantitativement la deuxième classe d'Ig où leur taux est de 0,9 à 4,5 g/L. Il s'agit majoritairement (80 %) d'IgA1, sous forme monomérique surtout (masse moléculaire 160 kDa, constant de sédimentation 7 S), mais aussi di ou trimérique, contenant alors une chaîne J,
  - dans les sécrétions, ce sont majoritairement (70 %) des IgA1 surtout sous forme dimérique. Leur masse moléculaire est alors de 390 kDa et leur constante de sédimentation de 11 S. Des formes polymériques peuvent se rencontrer. Ces IgA sécrétoires sont des Ig principales des larmes, du lait, des sécrétions nasales, bronchiques, gastro-intestinales et de l'urine. Par exemple, la salive contient 5 fois plus d'IgA que d'IgG, le liquide duodénal et les sécrétions bronchiques 3 fois plus. Dans le colostrum, leur concentration est de 20 à 40 mg/mL.

2. Particularités structurales

a) IgA1 et IgA2

- Les régions constantes des chaînes lourdes α1 et α2 possèdent 3 domaines (Cα1, Cα2 et Cα3) et un domaine variable (*fig. 7*). Il existe de plus un octapeptide C terminal ;
- La région charnière présente 26 acides aminés pour α1 et 13 pour α2. Il existe 3 ponts disulfures interchaînes lourdes au niveau de la région charnière ;
- Les chaînes lourdes et légères des IgA1 sont reliées par des ponts disulfures ;
- Pour les IgA2, les ponts disulfures entre chaînes lourdes et légères permettent de définir 2 variants dits allotypiques :
  – le variant A2m(1) ne présente pas de ponts disulfures entre les chaînes H et L. L'association est assurée par des liaisons non covalentes. En revanche, il existe un pont disulfure entre les cystéines aminoterminales des chaînes légères L formant des dimères de chaînes légères. L'IgA2m(1) est la plus fréquente chez les Caucasiens,
  – l'IgA2m(2) présente un pont disulfure entre chaînes lourde et légère. Elle est rencontrée chez une faible proportion de Caucasiens et dans une proportion plus importante chez les Noirs ;

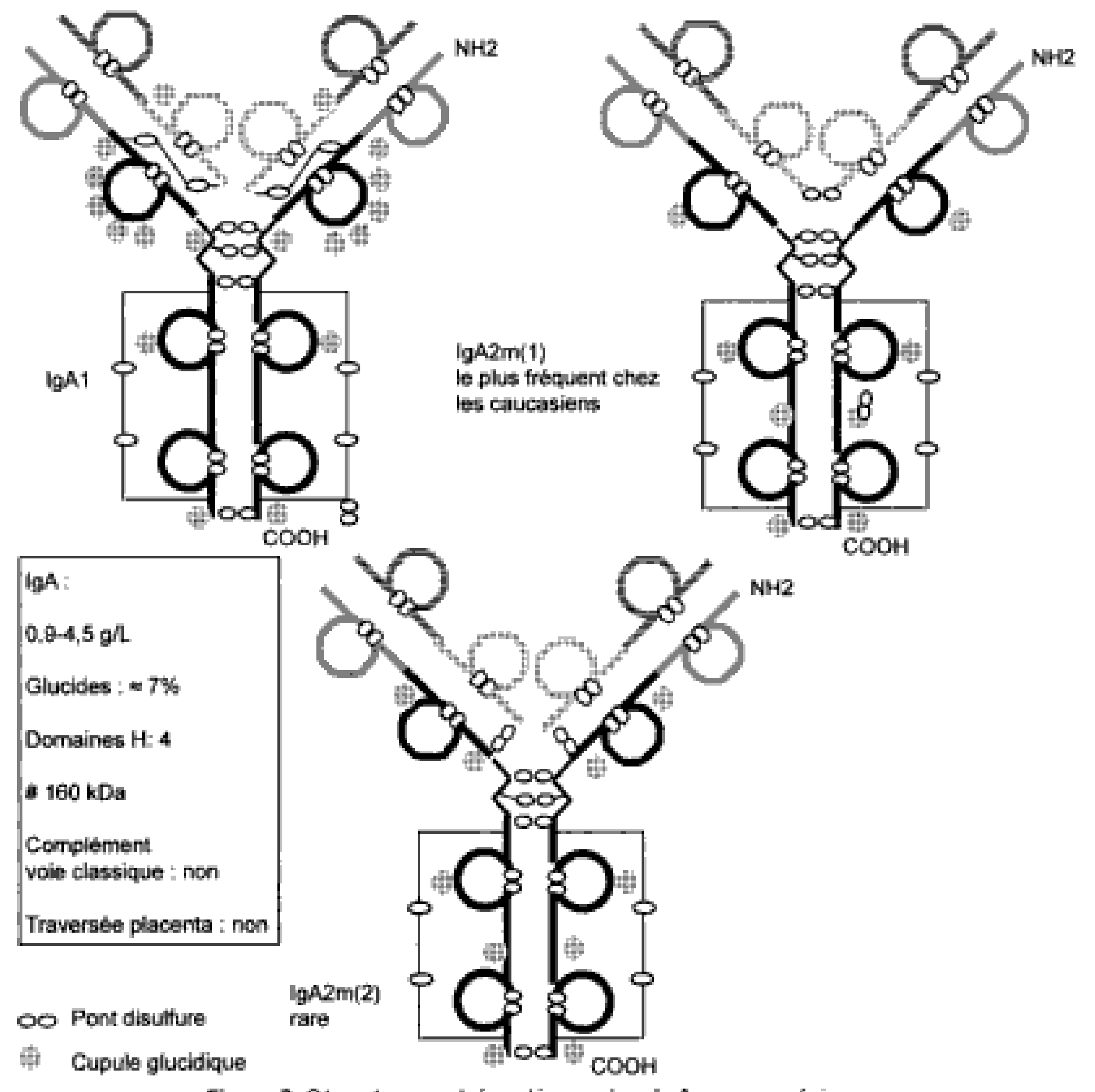


Figure 7. Structure schématique des IgA monomériques

- Il existe également une différence de glycosylation entre IgA1 et IgA2 (sucres différents, absence de glucide dans la région charnière des IgA2).

b) IgA dimérique, chaîne J et pièce sécrétoire

- Le dimère résulte de l'association de 2 monomères par 2 ponts disulfures, reliant les domaines Cα2 d'un monomère au Cα3 de l'autre monomère ;
- Une chaîne J (jonction) relie également les 2 monomères d'IgA. Sa masse moléculaire est de 23 à 26 kDa. Elle est faite d'un seul domaine, identique à celui des Ig (mais avec 8 feuillets β). Cette chaîne est reliée par pont disulfure à chaque monomère, engageant la cystéine avant-dernier acide aminé de l'extrémité C terminale d'une chaîne α de ces monomères. Elle existe également sur les IgM pentamériques (*cf. infra*) ;
- De plus, les IgA sécrétoires présentent une pièce sécrétoire S. C'est une glycoprotéine liée à la molécule d'IgA dimérique (existe aussi sur les IgM pentamériques). Sa masse moléculaire est de 70 kDa. Elle est formée d'une chaîne riche en glucide (20 %), divisée en 5 domaines avec des homologies entre eux et avec les domaines des Ig. Elle présente une affinité particulière pour la chaîne J et c'est à ce niveau qu'elle se lie en partie à l'IgA (ou l'IgM) polymérique. La liaison se fait aussi par pont disulfure avec le monomère d'IgA. La pièce sécrétoire semble s'enrouler autour de l'IgA. Chaque monomère de l'IgA se trouverait sur 2 plans perpendiculaires.

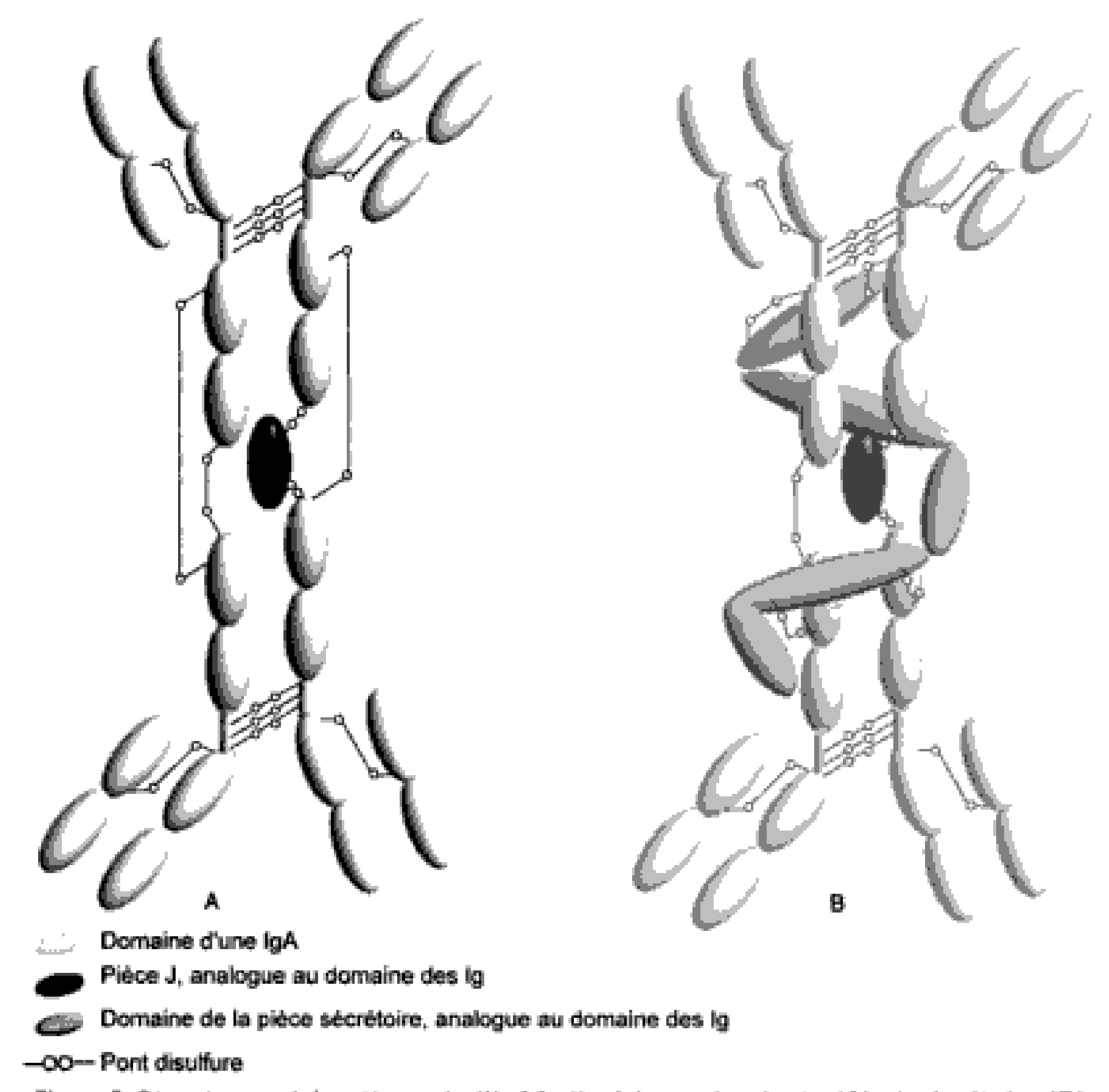


Figure 8. Structure schématique de l'IgA1 dimérique circulante (A) et sécrétoire (B)

c) Propriétés de la pièce sécrétoire

- Elle rend les IgA (et IgM) sécrétoires plus résistantes à la protéolyse ;
- Elle stabilise l'IgA2, d'allotype A2m1, qui manque de cohésion à cause de l'absence de pont disulfure entre les chaînes H et L.

d) Différentes formes de la pièce sécrétoire

- Libre dans les sécrétions ;
- Liée aux IgA (et IgM) polymérisées ;
- Liée à la surface des cellules épithéliales (*fig. 9*). En effet, un dimère d'IgA en provenance du liquide extracellulaire peut se fixer à la surface externe de la cellule épithéliale des muqueuses par un récepteur (poly-IgR ou poly-Ig récepteur). Il est synthétisé par cette cellule épithéliale (alors que l'IgA est synthétisée par les plasmocytes sous épithéliaux). Le complexe récepteur-IgA traverse la cellule par endocytose et est sécrété dans la lumière par exocytose. Ce relargage s'accompagne du clivage protéolytique du récepteur. La partie relarguée avec l'IgA prend le nom de pièce sécrétoire. Le reste du récepteur est hydrophobe et reste fixé dans la membrane.



Figure 9. Synthèse des IgA sécrétoires

3. Propriétés

- Rôle de l'IgA : c'est la principale Ig des sécrétions. Elle assure la défense localisée des muqueuses ;
- Fonctions effectrices du fragment Fc des IgA :
  - fixation sur un récepteur à la surface des cellules dendritiques, des macrophages, des neutrophiles et de certaines cellules T et B par le domaine Cα3,
  - traversée de l'épithélium intestinal (transcytose) par fixation sur un récepteur poly-IgR contenant la pièce sécrétoire, par les domaines Cα1 et Cα3 (*cf. propriétés biologiques du fragment Fc des Ig*),
  - activation par des IgA dimériques de la voie alterne du complément.

C. IgM

1. Caractéristiques biochimiques

- Elles peuvent exister sous forme monomérique à la surface des lymphocytes B, sous forme pentamérique dans le sang ou encore comme IgM sécrétoires dans les mêmes sécrétions que celles où l'on trouve l'IgA sécrétoire ;
- Le pentamère a une masse moléculaire de 950 kDa. Son taux sérique est de 0,6 à 2,5 g/L et sa mobilité électrophorétique de type β. Sa constante de sédimentation est de 19 S ;
- Il existe en théorie 10 sites Ac par molécule mais en fait, la valence des IgM varie de 1 à 10 ;
- Les IgM sont très glycosylées (12 %).

2. Particularités structurales

- Le pentamère a pour unité de base un monomère de 2 chaînes lourdes μ et 2 chaînes légères κ ou λ (*fig. 10*). Il existe un octopeptide supplémentaire en C terminale analogue à celui de l'IgA. Les chaînes μ ont un domaine variable, 4 domaines constants Cμ1 à Cμ4. Il n'y a pas de région charnière mais la molécule est assez mobile entre Cμ2 et Cμ3. Il existe dans chaque monomère un pont disulfure interchaînes lourdes entre les cystéines de chaque chaîne au niveau de la jonction Cμ2-Cμ3. Les 5 monomères sont reliés entre eux par 2 anneaux de ponts disulfures au niveau des Cμ3 et Cμ4 ainsi que par une pièce J (la même que dans les IgA), incorporée dans la structure pentamérique par des ponts disulfures unissant cette pièce J à 2 monomères, au niveau de leur Cμ4. Cette pièce joue un rôle dans le maintien de la structure pentamérique ;
- L'IgM de membrane à la surface des lymphocytes B est monomérique. Elle se termine alors par une séquence d'acides aminés hydrophobes assurant son ancrage dans la bicouche lipidique du lymphocyte B, suivi de quelques acides aminés intracytoplasmiques. Chaque molécule d'IgM membranaire est associée à 2 chaînes Igα et 2 chaînes Igβ formant le BCR (*B cell receptor*) comparable au TCR des lymphocytes T.

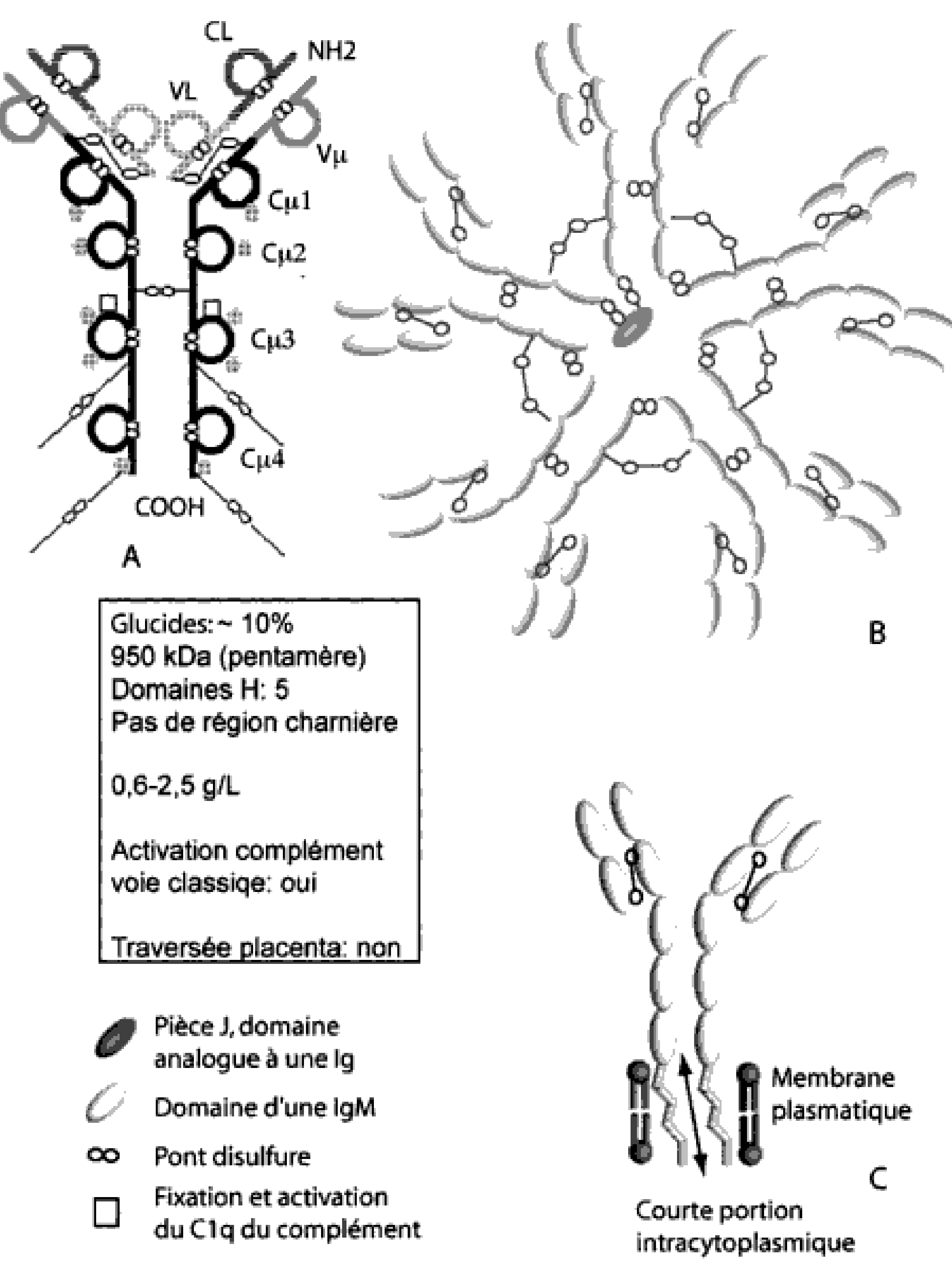


Figure 10. Structure schématique d'une IgM réduite à un monomère (A), d'une IgM pentamérique (B) et d'une IgM membranaire

3. Propriétés

- C'est la première classe d'Ac produits par une cellule B lors de son développement ;
- C'est aussi la classe majeure d'Ac sécrétés dans des stades précoces de la réponse primaire ;
- C'est la seule classe d'Ac synthétisés en réponse à un Ag thymo-indépendant ;

- Elles possèdent une forte activité agglutinante liée à leur structure pentavalente ;
- Fonctions dues au fragment Fc :
  - les domaines Cμ3 permettent la fixation à des récepteurs à la surface des cellules dendritiques et de certains lymphocytes,
  - les domaines Cμ1 et Cμ3 peuvent fixer la pièce sécrétoire (*cf. IgA*) et traverser les épithéliums pour donner des IgM sécrétoires,
  - les IgM sont très efficaces pour l'activation de la voie classique du complément (rôle du domaine Cμ3).

D. IgE

1. Caractéristiques biochimiques

- Elles sont en très faible concentration, leur taux sérique chez l'adulte non allergique est inférieur à 150 kU/L (1 U = 2,4 mg/L d'IgE). Une grande partie peut se lier à des récepteurs de la surface des polynucléaires éosinophiles et des mastocytes. C'est la raison pour laquelle leur taux sérique n'est qu'un reflet imparfait du taux réel d'IgE. Elles migrent en électrophorèse avec les IgA ;
- Elles existent sous forme monomérique, de masse moléculaire 190 kDa et de constante de sédimentation 8 S ;
- Les IgE sont thermolabiles (détruites par chauffage à 56 °C pendant 30'), contrairement aux autres classes d'Ig thermostables.

2. Particularités structurales

- Les IgE existent sous forme monomérique avec des chaînes légères de type κ ou λ (identiques à celles des autres Ig) et 2 chaînes lourdes ε de 550 acides aminés avec 1 domaine variable et 4 domaines constants Cε1 à Cε4 (*fig. 11*) ;
- Elles sont très riches en glucide (11 %) ;
- Il n'y a pas de région charnière ;
- Les chaînes H sont associées aussi par deux ponts disulfures situés entre des cystéines aux extrémités C et N terminales du Cε2 de chaque chaîne lourde ;
- On peut enfin noter que les 2 domaines Cε3 se repoussent l'un l'autre, alors que les 2 domaines Cε4 peuvent échanger des liaisons non covalentes.

3. Propriétés

- L'IgE se fixe par son fragment Fc (par Cε4) avec une forte affinité sur des récepteurs à la surface des mastocytes, basophiles, éosinophiles et avec une faible affinité sur les plaquettes, les macrophages-monocytes et quelques lymphocytes T et B. Le pontage par un Ag de deux molécules d'IgE fixées à la surface de mastocytes-basophiles entraîne leur dégranulation, libérant des médiateurs dont l'histamine. L'IgE joue donc un rôle primordial dans l'hypersensibilité de type immédiat ;
- Elle intervient également dans les défenses antiparasitaires en se fixant par son Fc (Cε4) à des récepteurs à la surface plaquettaire et des éosinophiles.

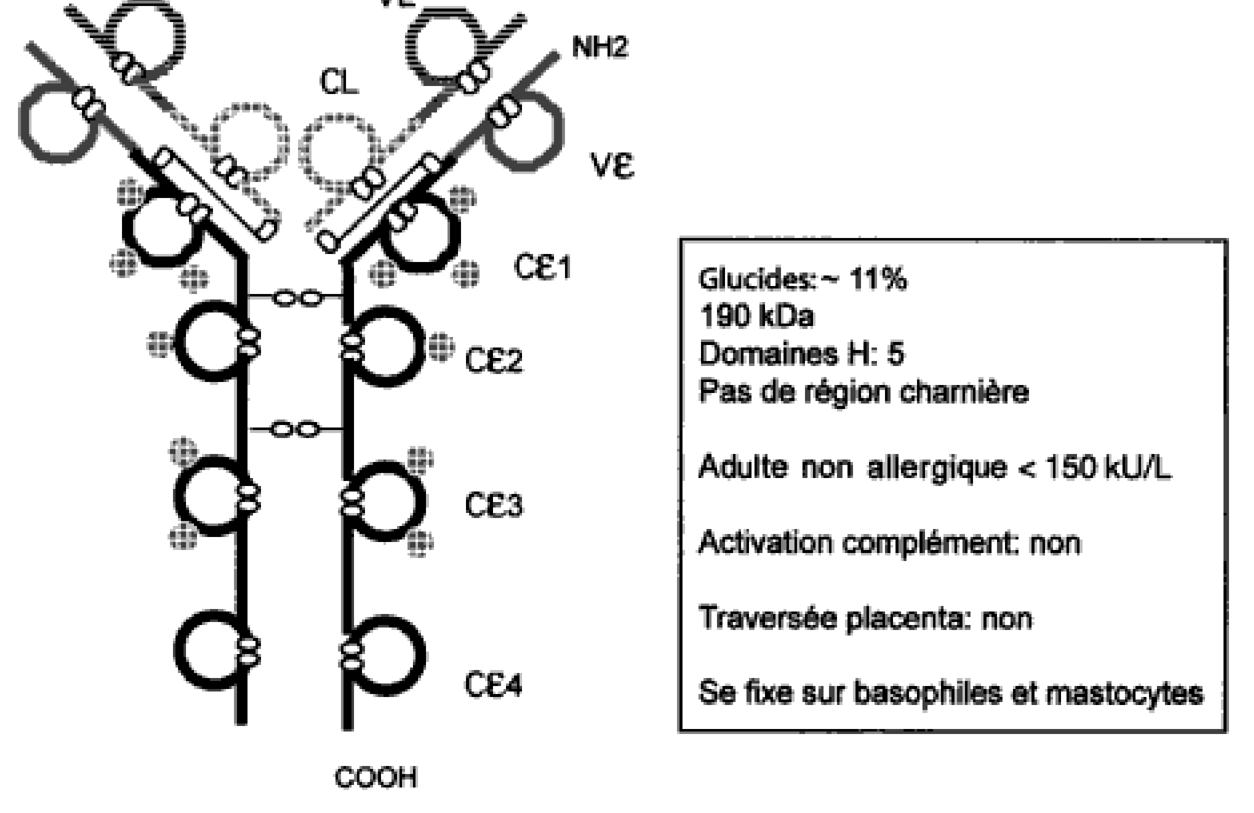


Figure 11. Structure schématique de l'IgE

E. IgD

1. Caractéristiques biochimiques

- Elles existent en très faible quantité dans le sérum, moins de 0,3 % des Ig sériques, sous forme monomérique, de masse moléculaire 175 kDa et de constante de sédimentation de 7 S ;
- On les trouve également à la surface des lymphocytes B. 5 à 10 % des lymphocytes B sont porteurs d'IgD à leur surface où elles sont alors associées à des IgM de membrane. L'IgD et l'IgM de membrane sur un même lymphocyte B possèdent le même type de chaîne légère κ ou λ et partagent le même paratope, et donc la même spécificité antigénique.

2. Particularités structurales

- Elles sont très glycosylées (12 %) ;
- La chaîne δ présente 4 domaines constants Cδ1 à Cδ4, un domaine variable et une longue région charnière de 64 acides aminés (*fig. 12*) ;
- Les 2 chaînes lourdes sont réunies par un seul pont disulfure en C terminal de la charnière.

3. Propriétés

Elles sont mal connues. L'IgD pourrait bloquer les cellules B autoréactives au cours du développement.

Le *tableau 1* reprend les principales caractéristiques des différentes Ig humaines.

Tableau 1. Propriétés chimiques, physiques et biologiques des Ig humaines

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Chaîne lourde Chaîne légère Variants isotypiques	γ κ ou λ IgG1 à IgG4	α κ ou λ IgA1, IgA2	μ κ ou λ –	δ κ ou λ –	ε κ ou λ –
Formule moléculaire	Monomère	Mono, di, trimère	Pentamère	Monomère	Monomère
Nombre de domaines chaîne lourde	4	4	5	4	5
Région charnière (nombre d'acides aminés)	12 à 62 $\gamma 1 = 15$ $\gamma 2 = 12$ $\gamma 3 = 62$ $\gamma 4 = 12$	$\alpha 2 = 13$ $\alpha 1 = 26$	0	64	0
Chaîne J et pièce sécrétoire	Non	Oui	Oui	Non	Non
Mr (kDa)	146 (IgG1, 2,4) 170 (IgG3)	160 (monomère) 400 (dimère)	950	175	190
Contenu en glucide (%)	2 à 3	7	10	12	11
Taux sérique (g/L)	12 (8 à 18)	2 (0,9 à 4,5)	1 (0,6 à 2,5)	trace	< 0,0003
% des Ig sériques	75 à 85	7 à 15	5 à 10	0,3	0,003
Demi-vie (jours)	23	5,8	5,1	2,8	2,5
Taux de synthèse (mg/kg/jour)	33	24	6,7	0,4	0,016
Fixation du C Voie classique IgG1, (2), 3	IgG1, 2, 3	Non	Oui +++	Non	Non
Valence	2	2, 4, (6)	5 (10)	2	2
Traversée du placenta	++ (IgG2 ±)	–	–	–	–
Fixation aux macrophages et neutrophiles	++	(+)	–	–	Faible affinité
Fixation aux mastocytes-basophiles	Faible affinité	–	–	–	+++
Autres propriétés	Réponse secondaire Neutralisation (toxine) Opsonisation	Protection muqueuse Neutralisation de toxine Opsonisation	Réponse primaire. Récepteur lympho B Neutralisation (toxine)	Surface des lympho B	Anaphylaxie Défense anti-parasitaire
Thermostabilité (56 °C, 30')	Oui	Oui	Oui	Oui	Non

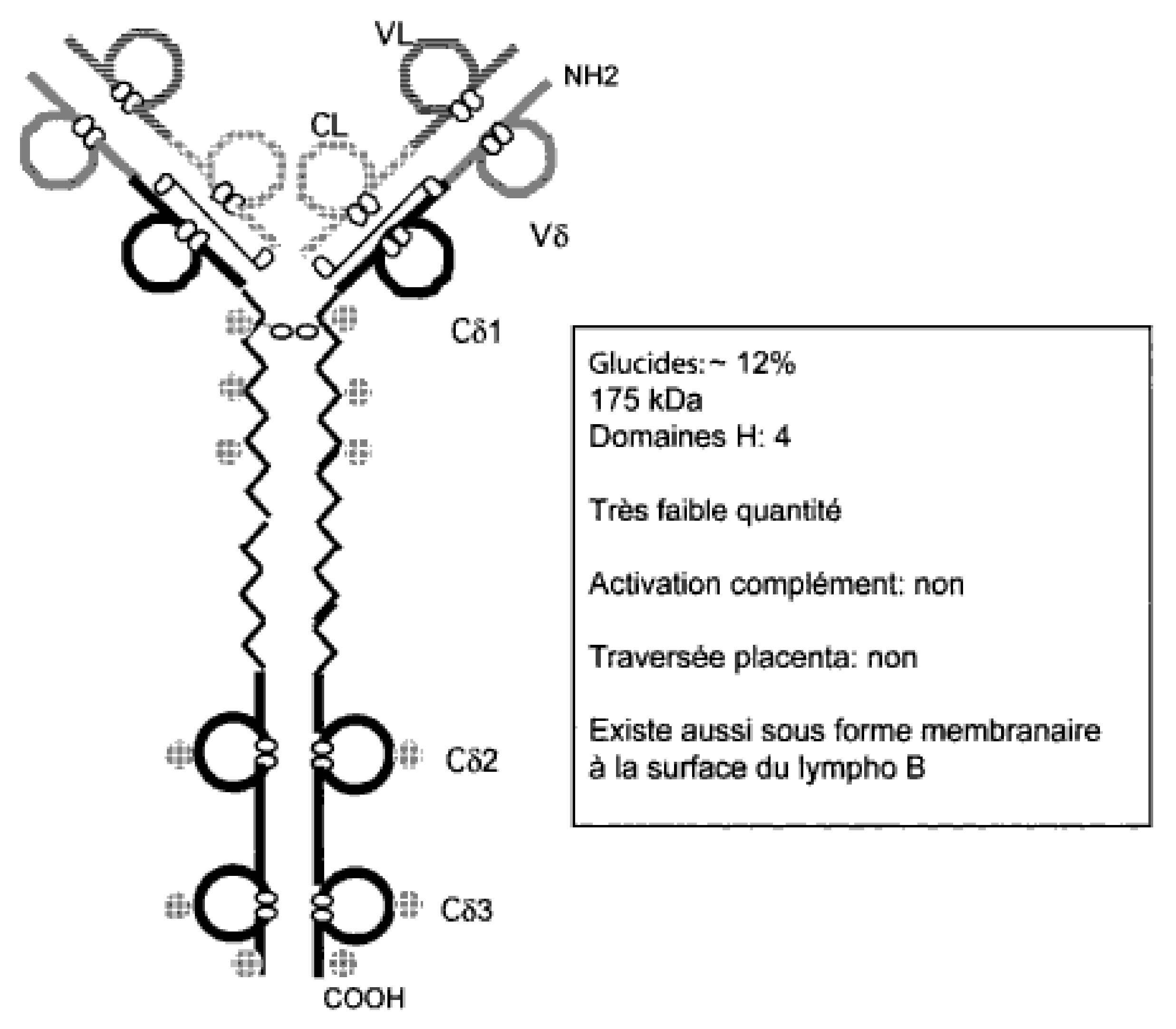


Figure 12. Structure schématique de l'IgD

III. Fonctions effectrices et propriétés biologiques des fragments Fc et Fab des Ig

Ces fonctions sont résumées sur la *figure 13*.

A. Propriétés biologiques du fragment Fab ou F(ab')2.

- La structure du site Ac a été envisagée précédemment. On peut rappeler que la taille de ce site Ac ou paratope permet de recevoir 4 à 5 sucres rigides d'un déterminant glucidique ou être en contact avec une dizaine d'acides aminés d'un déterminant peptidique. La liaison Ag-Ac est non covalente, réversible, et fait intervenir uniquement des liaisons faibles, liaisons hydrogènes, électrostatiques, forces de Van der Waals, liaisons hydrophobes ;
  La combinaison de plusieurs de ces liaisons permet d'obtenir une constante d'association forte, de 10^4 à 10^{12} L/M, plus forte qu'une réaction enzyme-substrat. Cela peut expliquer que des méthodes de dosages de substances présentes à des taux faibles soient basées sur une réaction Ag-Ac.

- Le domaine CH1 peut fixer le composant C4b du complément ou être reconnu par certains facteurs rhumatoïdes.

B. Propriétés biologiques du fragment Fc des Ig

1. Activation du complément

a) Voie classique

Les IgG1, 2 et 3 par leur domaine CH2 et les IgM par leur domaine CH3 peuvent activer le C1q après fixation de l'Ac sur son Ag. Une seule molécule IgM pentamérique suffit à activer le complément en raison de 2 sites proches. En revanche, il faut 2 molécules d'IgG côte à côte pour activer le complément.

b) Voie alterne

Les Ac des différentes classes peuvent activer la voie alterne, mais ils ne sont pas nécessaires.

2. Traversée du placenta

La fixation sur les cellules du trophoblaste permet le transfert placentaire actif des IgG1, 3 et 4. Les IgG2 ont un passage plus lent (rôle des domaines Cγ2 et Cγ3). Ce transfert s'accentue à partir du 7ᵉ mois et atteint son maximum en fin de grossesse lorsque les concentrations d'IgG maternelles et dans le sang du cordon sont égales. Les IgM et IgA trouvées à la naissance chez le nouveau-né ne sont pas d'origine maternelle mais bien synthétisées par le fœtus (utilité : dosage des IgM et IgA chez le nouveau-né pour savoir s'il s'agit d'une infection congénitale).

3. Catabolisme des Ig

Il est lié au CH2 des différentes classes et sous-classes où se fixent des enzymes protéolytiques.

4. Fixation à des récepteurs de surface cellulaire

Il existe à la surface de nombreuses cellules des récepteurs pour le fragment Fc des Ig. L'occupation des récepteurs entraîne une activation et une réponse cellulaire (phagocytose des complexes immuns ou de micro-organismes recouverts d'Ig, phénomène d'ADCC, hypersensibilité immédiate, activité antiparasitaire).
On en distingue plusieurs types :

- Les récepteurs de forte affinité, FcRI, qui fixent un monomère d'Ac et sont activés après fixation de l'Ag à l'Ac, lui-même préalablement fixé à son récepteur cellulaire ;
- Les récepteurs de basse affinité, FcRII et FcRIII, qui fixent des complexes Ag-Ac multivalents préalablement formés.

Plus précisément :

- Les récepteurs de forte affinité pour le fragment Fc des IgG (CD64), RFcγRI, sont trouvés surtout à la surface des macrophages-monocytes, des polynucléaires neutrophiles des cellules dendridiques et sur quelques cellules T ;

- Les récepteurs de faible affinité pour le fragment Fc des IgG, RFcγRII (CD32) et RFcγRIII (CD16) sont présents sur les macrophages-monocytes, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, mastocytes (RFcγIII), plaquettes, sous-population B et T, cellules endothéliales, cellules du trophoblaste, cellules NK (RFcγRIII) ;
- Les récepteurs pour les fragments Fc des IgE, de haute affinité, RFcεRI, sont rencontrés à la surface des basophiles et des mastocytes, des cellules de Langerhans, des éosinophiles ;
- Les récepteurs pour les fragments Fc des IgE de faible affinité, RFcεRII (CD23) sont présents sur les mastocytes, polynucléaires éosinophiles, plaquettes, macrophages-monocytes, quelques cellules T et B ;
- Il existe un récepteur pour le Fc des IgA, RFcα (CD89), sur les macrophages, les neutrophiles les cellules T et B activées ;
- Enfin, il existe un récepteur poly-IgR (récepteur des Ig polymériques) à la surface des cellules épithéliales muqueuses et des canaux excréteurs des glandes exocrines. Il fixe les IgA dimériques (et IgM) et permet la transcytose, passage de l'IgA (ou de l'IgM) du pôle antiluminal au pôle luminal de la cellule épithéliale de l'intestin ou des canaux sécrétoires des glandes exocrines. Le passage s'effectue dans une vacuole qui traverse le cytoplasme. Amputé de son domaine transmembranaire, le récepteur poly-IgR tronqué devient la pièce sécrétoire inclue dans la structure des IgA sécrétoires (ou IgM sécrétoires) (*fig. 8*).

Ces récepteurs au fragment Fc ont une structure complexe. Ils comprennent toujours une chaîne α organisée en domaines analogues au domaine des Ig.
Le *tableau 2* résume les fonctions portées par le fragment Fc.

Tableau 2. Fonctions biologiques du fragment Fc des Ig

Fonctions	Domaines impliqués	Effets	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA	IgD	IgE
Catabolisme (1/2 vie en jours)	CH2	Catabolisme	21	21	7	21	5	6	2,8	2,3
Transfert placentaire	CH2, CH3	Immunité passive du nouveau-né	+++	+	++	++	–	–	–	–
Traversée épithélium intestinal par fixation sur poly-IgR	CH1, CH3	Protection muqueuse	–	–	–	–	+	+++	–	–
Activation C Fixation C1q (voie classique)	Cγ2, Cμ3	Immunité humorale	++	±	++	–	+++	–	–	–
Fixation aux monocytes-macrophages	Cγ3, Cε4	Effecteur cellulaire de l'immunité humorale	+++	++	+++	+++	–	–	–	+
PN neutrophiles	CH1, CH3	Effecteur cellulaire de l'immunité humorale	+	+	+	+	–	+	–	–
Mastocytes-basophiles	Cγ3, Cε4	Anaphylaxie	±	±	±	±	–	–	–	+++
PN éosinophiles	Cγ3, Cε4	Parasitotoxicité, toxicité tissulaire	+	+	+	+	–	–	–	++
Plaquettes	Cγ3, Cε4	Parasitotoxicité, hyper sensibilité humorale	+	+	+	+	–	–	–	++
Lympho T et B	Cγ3, Cε4	Régulation	qq ¢	qq ¢	qq ¢	qq ¢	qq ¢	qq ¢	qq ¢	qq ¢
Cellules NK	Cγ3	ADCC	+	+	+	+	–	–	–	–

IV. Métabolisme et physiologie des Ig

- La demi-vie plasmatique des IgG est d'environ 3 semaines (sauf IgG3). Les autres classes ont une demi-vie plus courte : IgA et IgM de 5 à 7 jours, IgD et IgE de 2 à 3 jours ;
- Les plasmocytes à IgG et IgM sont rencontrés dans tous les organes lymphoïdes secondaires, surtout la rate et les ganglions, les plasmocytes à IgG dans la moelle osseuse ;
- Les plasmocytes à IgD sont rares et disséminés ;
- Les plasmocytes à IgE sont volontiers localisés au niveau des muqueuses ;
- Les plasmocytes à IgA existent dans les ganglions, la rate, mais surtout au niveau de la *lamina propria* de la muqueuse digestive, dans le chorion des muqueuses respiratoires, des glandes mammaires et salivaires ;
- Les IgM sont les premières à apparaître après primo-immunisation par voie parentérale, puis sont progressivement remplacées par des IgG et des IgA. Cependant, certains Ac seront synthétisés toute la vie sous forme d'IgM. Il s'agit d'Ac réguliers naturels (Ac anti-A, anti-B des groupes sanguins, pas d'immunisation patente), mais parfois d'Ac immuns (il existe une immunisation patente, par exemple Ac antipolysaccharides bactériens). D'importantes quantités d'IgA sécrétoires sont produites lorsque l'immunisation se produit par voie digestive ou respiratoire (par exemple, intérêt de la vaccination antipolio par voie orale).

La répartition des différentes classes d'Ig varie donc :
- Les IgM sont essentiellement intravasculaires ;
- Les IgG, et IgA se répartissent de façon égale entre compartiments intra et extravasculaires. Les IgA plasmatiques sont des monomères alors que les IgA sécrétoires sont produites par les plasmocytes du tissu conjonctif, avec une chaîne J et une pièce sécrétoire ;
- Les IgE sont captées avec avidité sur des récepteurs à la surface des mastocytes et peuvent être peu représentées dans le sang.

V. Ontogenèse des Ig

Le fœtus est capable de synthétiser de faibles quantités d'IgM dès la 10e semaine.
Le taux d'IgM à la naissance ne doit pas dépasser 10 % de la valeur adulte, sinon on recherchera des infections congénitales (toxoplasmose, syphilis).
Les IgG d'origine maternelle traversent le placenta à partir de la 20e semaine.
À la naissance, on trouve dans le sang des nouveau-nés des IgG dont la majorité est d'origine maternelle par transfert actif de la mère vers le fœtus (que la mère soit normo ou hypoglobulinémique). Leur taux est d'environ 110 % du taux de l'adulte.
Après l'accouchement (*fig. 14*) :
- le taux d'IgM croît et atteint le taux adulte à 1 an ;
- le taux d'IgG diminue jusqu'à l'âge de 2 ou 3 mois car la synthèse des IgG par l'enfant n'est pas suffisante pour contrebalancer le catabolisme des IgG maternelles.

Il existe donc une hypogammaglobulinémie physiologique entre 2 et 3 mois qui expose les enfants à diverses infections. Le taux adulte est atteint vers 2 ou 3 ans ;
- la production d'IgA débute après la naissance et atteint le taux adulte entre 10 et 14 ans ;
- le taux d'IgE croît de la naissance à 14 ans.

Il faut considérer ces données avant d'interpréter une hypogammaglobulinémie chez l'enfant.

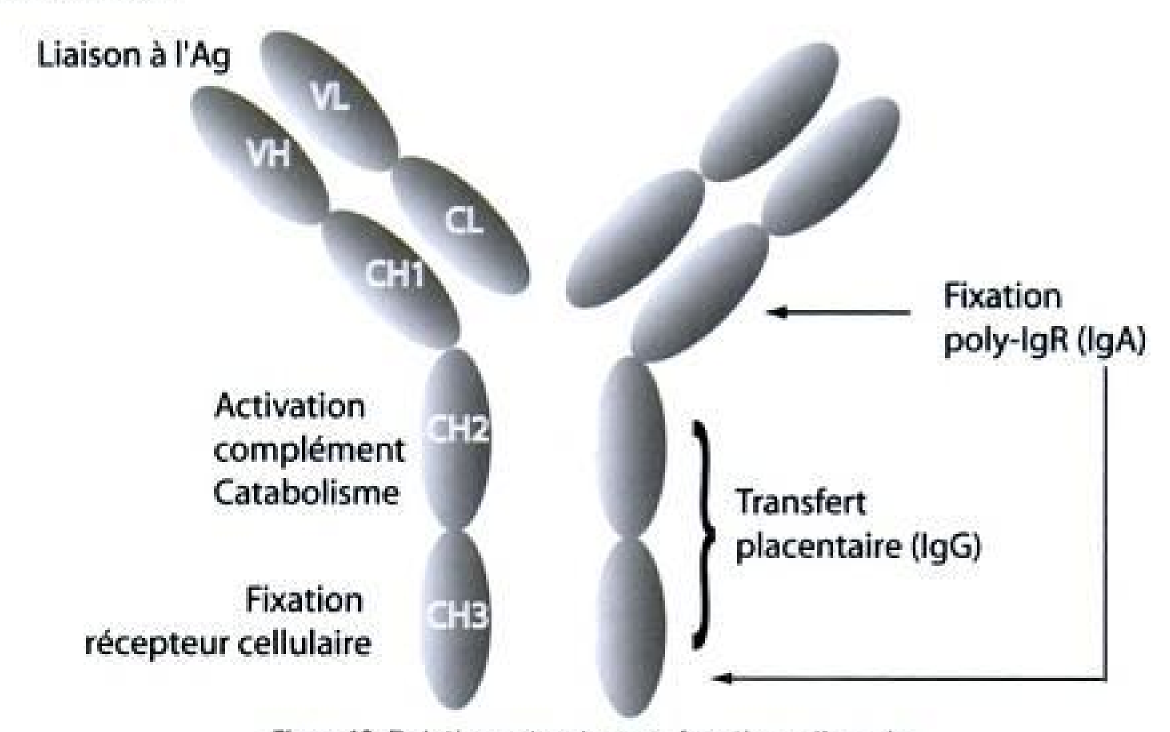


Figure 13. Relations structures – fonctions d'une Ig

VI. Moyens d'études des Ig

A. Technique d'étude des Ig

1. Électrophorèse sur acétate de cellulose

- Les Ig sont hétérogènes. Elles migrent dans les régions γ et β jusqu'à la limite des $\alpha 2$;
- Les IgG migrent principalement en γ et s'étendent en β ;
- Les IgM comme les IgA migrent principalement en β ;
- Les IgE migrent avec l'IgA ;
- Une Ig monoclonale présente un pic étroit.

2. Immuno-électrophorèse

Cette technique combine séparation électrophorétique en gélose et immunoprécipitation par des antisérums spécifiques, se traduisant par des arcs de précipitation. Une Ig monoclonale se traduira par l'apparition d'une deuxième courbure de l'arc normal avec trait épais, courbure marquée, position plus proche de l'immunsérum révélateur.

3. Fractionnement par relargage

L'addition de sulfate d'ammonium à doses croissantes précipite les protéines sériques. Ce sont des gammaglobulines qui précipitent les premières.

4. Fractionnement par dilution

L'addition d'eau distillée au sérum ou la dialyse contre de l'eau distillée précipite les euglobulines parmi lesquelles se trouve l'IgM.
L'addition de solvant organique modifie la solubilité des protéines. Ainsi l'éthanol (méthode Cohn) permet d'obtenir des gammaglobulines industriellement.

5. Ultracentrifugation

Elle sépare les Ig en fonction de leur constante de sédimentation (environ 7 S pour les IgG, A, E et D et 19 S pour les IgM).

6. Chromatographie sur échangeur d'ions

DEAE-cellulose pour la purification des Ig.

7. Chromatographie d'affinité

Affinité des IgG1, 2 et 3 avec la protéine A du staphylocoque (préalablement fixé sur des billes de sépharose).

8. Biologie moléculaire

On peut déterminer le réarrangement des gènes des Ig au niveau d'une cellule. Dans les différentes cellules d'une prolifération monoclonale, on observe un même réarrangement. Une prolifération polyclonale se traduit au contraire par une diversité de réarrangement.

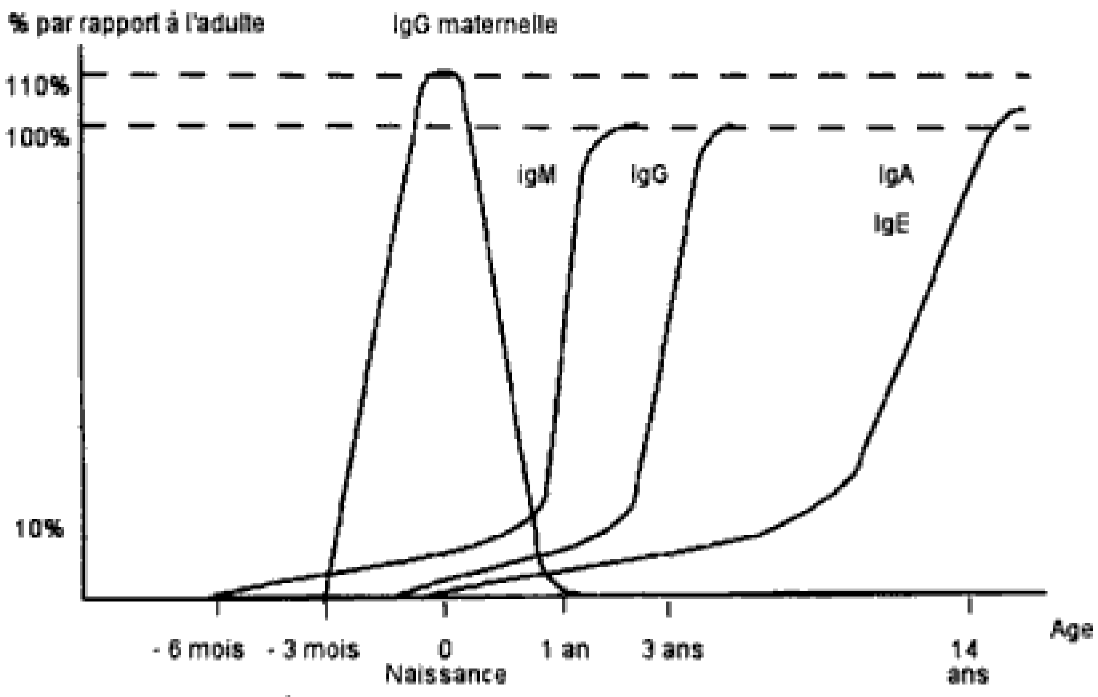


Figure 14. Évolution du taux des immunoglobulines avec l'âge

B. Sources d'Ig

1. Ac polyclonaux

Ils sont obtenus après immunisation de l'animal par un Ag connu. Il existe une association entre allotypes, isotypes et taux de production d'Ac spécifique d'un Ag. Par exemple, les Ac antipolysaccharides bactériens sont surtout des IgM, des IgG2 et des IgA2. Les Ac antirhésus D sont surtout des IgG1 et des IgG3.

2. Ac monoclonaux

- Protéine de myélome ;
- Hybridome.

VII. Génétique de la structure des Ig

Les Ig humaines dérivent de 3 groupes de gènes localisés sur des chromosomes différents auxquels il convient d'ajouter les gènes de la chaîne J et de la pièce sécrétoire. La très grande diversité des Ig ne provient cependant que d'un nombre limité de gènes, une centaine.

A. Gènes codant pour les chaînes lourdes

Ils sont situés sur le bras long du chromosome 14 (*fig. 15*). Les chaînes lourdes sont codées par 4 groupes de gènes, 3 pour la région variable, 1 pour la région constante.
Le génome responsable de la synthèse de la partie variable VH de la chaîne lourde comprend 3 groupes de nombreux gènes : V (variable), D (diversité) et J (jonction) situés du côté 5' du DNA.
Chaque gène V est précédé d'une séquence signal. La partie variable de la chaîne lourde d'un Ac donné est encodée par un segment d'ADN résultant de 2 réarrangements génomiques se produisant dans la prolymphocyte B. Le premier élimine l'ADN situé entre un gène D et un gène J. Le second aboutit à une délétion entre un gène V et un gène DJ réarrangé (*fig. 16*).
Un gène V, un gène D et un gène J se trouvent ainsi mis côte à côte et vont participer au codage de la partie variable de la chaîne lourde. Le gène V réarrangé encode pour les régions FR1 (1er segment du Framework), CDR1 (1re région hypervariable), FR2, CDR2, une partie de FR3. Le gène D encode pour la fin de FR3 et CDR3. Le gène J encode pour FR4 (*fig. 17*).
La région constante est encodée par 9 gènes fonctionnels (*fig. 15*) et il y a en plus au moins 3 pseudogènes. En aval des gènes VDJ et d'amont en aval, on trouve les gènes codant pour les chaînes μ, δ, $\gamma3$, $\gamma1$, $\alpha1$, $\gamma2$, $\gamma4$, ε et $\alpha2$. La structure en exons de chacun de ces gènes correspond à la structure en domaines des régions constantes.

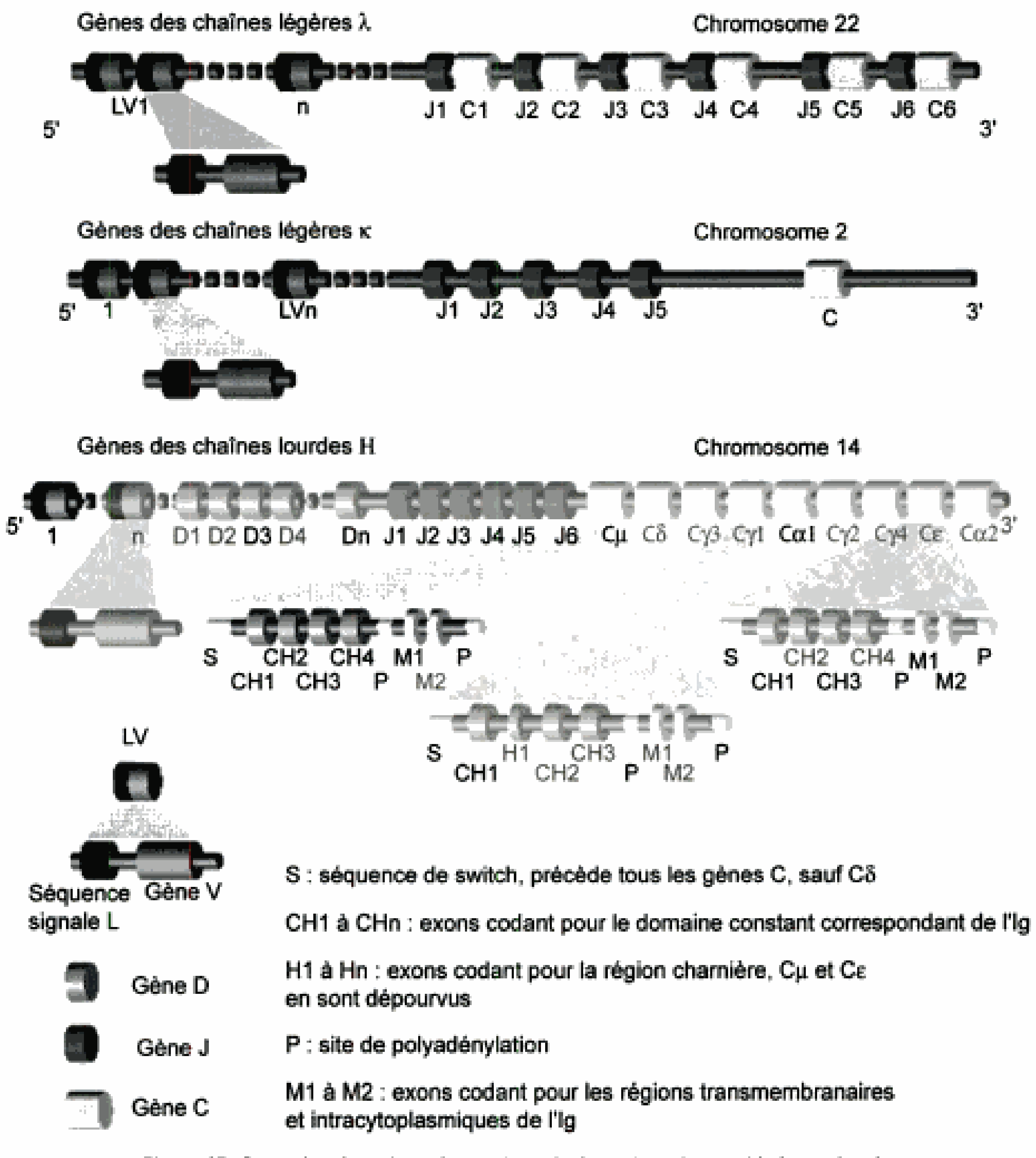


Figure 15. Organisation des gènes des chaînes lourdes et légères des Ig (les pseudogènes ne sont pas représentés)

De 5' en 3', on trouve pour chacun de ces gènes encodant les chaînes lourdes :

- une séquence intronique *switch* sauf pour Cδ ;
- un exon encodant pour le 1er domaine CH1 ;
- un ou plusieurs exons encodant pour la région charnière, sauf pour Cμ et Cε ;
- 2 (Cγ, Cα, Cδ) ou 3 (Cμ, Cε) exons codant pour les régions CH2 à CH3/CH4 ;
- une courte séquence contiguë au dernier exon de la région constante et codant pour l'extrémité carboxyterminale de la forme sécrétée de l'Ig, suivi d'un codon stop et d'un site de polyadénylation ;

- un ou 2 exons codant pour les domaines transmembranaires et intracytosoliques des Ig avec en 3' du dernier exon un second codon stop, suivi d'un second site de polyadénylation.

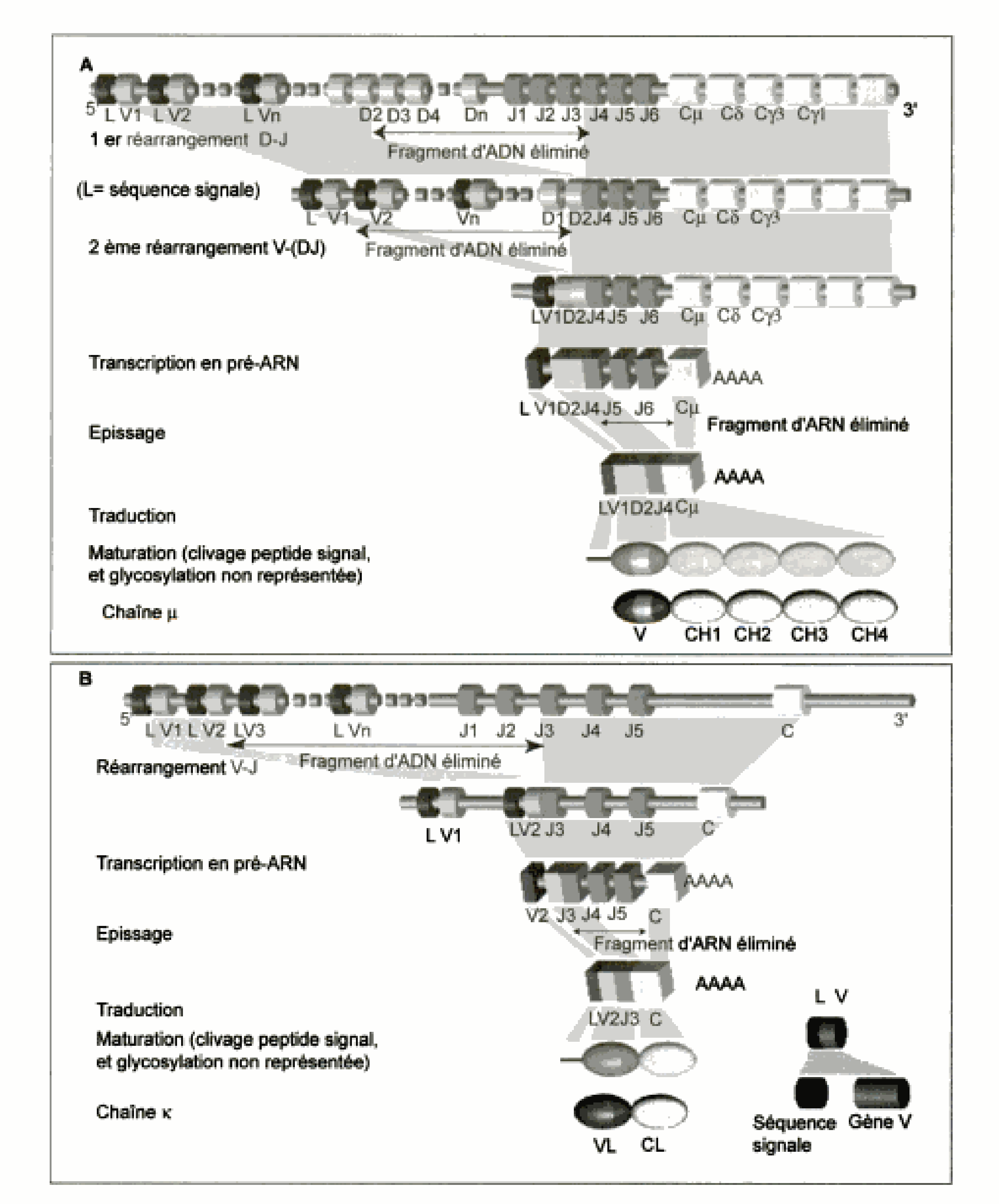


Figure 16. Réarrangement des gènes des Ig, étapes de transcription, traduction et maturation pour une chaîne lourde, exemple μ (A) et pour une chaîne légère, exemple κ (B). L'organisation des gènes C en exons et introns n'est pas détaillée

B. Gènes codant pour les chaînes légères

- Les gènes encodant pour les chaînes λ sont situés sur le chromosome 22 et ceux des chaînes κ sur le chromosome 2 (*fig. 15*) ;
- Il existe pour la chaîne κ une série de plusieurs gènes V et J et un seul gène C sans intron ;
- Pour la chaîne λ, il existe aussi une série de plusieurs gènes V, J et au moins 6 gènes C fonctionnels sans intron, responsables des isotypes de ces chaînes (un individu possède l'ensemble de ces isotypes dans son sérum). Les segments de gènes Jλ accompagnent les gènes Cλ. Chaque gène V est toujours précédé d'une courte séquence L (*leader*) codant pour le peptide signal ;
- La partie variable de la chaîne légère est encodée par un segment d'ADN résultant du réarrangement d'un gène V et d'un gène J pour la chaîne κ (*fig. 16*) et d'un gène V avec un complexe JC pour la chaîne λ ;
- Le réarrangement se déroule dans le lymphocyte pré-B ;
- Dans le gène VJ réarrangé, les gènes V encodent pour les segments (*fig. 17*) FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 et une partie de CDR3. Les gènes J encodent pour une partie du CDR3 et FR4. Les gènes C encodent pour la partie constante de la chaîne légère.

Figure 17. Gènes V, D, J. Contrôle des parties hypervariables et de la charpente des Ig

C. Transcription du gène réarrangé

Le gène réarrangé des chaînes lourdes est transcrit dans le lymphocyte en un pré-ARNm – introns et exons – allant de la séquence signal L précédant le gène V utilisé au gène μ ou δ, et se terminant par une queue poly-A (*fig. 16*).
Un épissage fait perdre à cet ARN la portion comprise entre J (recombiné dans VDJ) et C, ainsi que les introns entre séquence *leader* et V et entre les exons du gène C. Les exons (VDJ) et C sont raccordés les uns aux autres. Le pré ARNm devient ainsi un ARNm mature qui donnera naissance à la chaîne lourde après traduction ribosomale et clivage du peptide signal à la surface du réticulum endoplasmique.
Un mécanisme similaire intervient pour les chaînes légères (*fig. 16*). Le gène recombiné est transcrit en ARNm dont la maturation va conduire à l'excision de l'intron entre séquence *leader* et gène V, et à l'excision de l'ADN entre le gène J choisi et le gène C.
Les ponts disulfures entre chaînes lourdes sont créés sur les chaînes naissantes dans le réticulum. La structuration de l'Ig en chaîne lourde et légère a lieu très rapidement dans le réticulum (les chaînes lourdes seules seraient toxiques pour la cellule).
La glycosylation est initiée dans les citernes du réticulum et se poursuit dans l'appareil de Golgi.

D. Ig membranaires et Ig sécrétées

Tous les isotypes des Ig peuvent être produits soit sous forme sécrétée, soit sous forme de récepteur lié à la membrane. Les formes sécrétées se terminent par une courte séquence à leur extrémité carboxyterminale. Les formes membranaires n'ont pas cette courte séquence mais un domaine hydrophobe (traversée de la bicouche lipidique), et une courte portion intracytoplasmique. Les formes membranaires sont toujours monomériques.
Chaque gène d'Ig comporte après son dernier exon codant pour CH3 ou CH4 une courte séquence encodant pour l'extrémité C terminale de l'Ig sécrétée, suivie d'un codon stop, d'un site de polyadénylation, d'un ou 2 exons encodant pour la partie intramembranaire et cytosolique, un second codon stop et un second site de polyadénylation (*fig. 15*).
Les événements qui président à la forme sécrétée ou membranaire dépendent du site de terminaison de la transcription utilisée par le transcrit initial. Si la transcription prend fin au second codon stop, le transcrit primaire inclut les 2 exons des séquences membranaires et la séquence codant pour la courte portion C terminale spécifique des Ig sécrétées. Cette dernière est épissée au niveau d'un site d'épissage caché dans le dernier exon de la région constante. Les exons des séquences membranaires sont joints aux exons des domaines constants. On a ainsi l'ARNm de l'Ig transmembranaire.
Si la transcription se termine au premier codon stop, le premier site de polyadénylation est utilisé, les exons du domaine membranaire sont exclus.

E. Synthèse simultanée des IgM et des IgD

L'IgD peut être coexprimée avec l'IgM à la surface des cellules B matures mais vierges. Les lymphocytes B qui expriment IgM et IgD transcrivent 2 ARN primaires :

- La transcription peut s'arrêter au site de polyadénylation après la séquence codant pour l'IgM sécrétée, ou au site de polyadénylation après l'exon codant pour sa séquence membranaire. Les exons codant pour l'IgD ne sont pas inclus et l'on a une IgM membranaire ou sécrétée.
- La transcription utilise les sites de polyadénylation du gène δ (*fig. 15*). Alors, on obtient un long transcrit incluant le gène Cμ et s'arrêtant soit après la séquence codant pour l'IgD sécrétée, soit après l'exon codant pour la partie membranaire de l'IgD. Un épissage enlève alors les exons et introns du gène Cμ et l'on obtient une IgD membranaire ou sécrétée selon le site de polyadénylation δ utilisé.

C'est donc l'utilisation différentielle de sites de polyadénylation qui permet la synthèse d'IgM ou d'IgD, membranaires ou sécrétées.

F. Commutation des plasmocytes à IgM en plasmocytes synthétisant une autre classe d'IgG

Au cours de leur développement, après stimulation antigénique, les plasmocytes, après avoir utilisé les gènes μ et δ peuvent produire des Ig d'un autre isotype en utilisant les autres gènes encodant pour les régions constantes lourdes, mais la spécificité antigénique (due au V(D)J réarrangé) reste. L'association d'une même région variable peut se faire avec différentes régions constantes. C'est la commutation de classe (*switch* ou commutation isotypique).

Il n'y a pas de commutation κ-λ, car les chaînes légères sont codées sur des chromosomes différents. Certains plasmocytes ne commutent pas et synthétisent des IgM (par exemple, IgM des Ac naturels des groupes sanguins, IgM contre des polysaccharides bactériens).

On comprend alors pourquoi la réponse primaire est une réponse à IgM, alors que la réponse secondaire est à IgG, A, E, Ac aux fonctions plus spécialisées. Ainsi, une commutation préférentielle IgM → IgA prend place dans le tissu lymphoïde sous muqueux, alors qu'une commutation IgM → IgG, IgG → IgA) a lieu dans les ganglions.

Cette commutation résulte de l'élimination de l'ADN entre VDJ et un segment de gène C autre que Cμ et Cδ. La commutation est donc irréversible. Elle fait appel à des séquences de commutation introniques situées en amont de chaque gène encodant pour la partie constante des chaînes lourdes, à l'exception de δ (il n'y a pas de commutation μ-δ, les chaînes δ résultent d'un épissage).

Ces régions sont de courtes séquences répétitives qui peuvent s'apparier, formant ainsi une boucle qui sera excisée, amenant en contact la région VDJ réarrangée avec des gènes C autres que μ ou δ. Les mécanismes régulateurs sont mal compris et font intervenir des facteurs de transcription nucléaire. Sous l'influence des cytokines sécrétées par les lymphocytes T, il y aurait accessibilité accrue à ces séquences introniques.

VIII. Origine de la diversité des Ac

La diversité des sites Ac pour s'adapter à l'univers des déterminants antigéniques est considérable (théoriquement, plus de 10^8 possibilités).
Cette grande hétérogénéité s'explique en considérant la diversité de la lignée germinale et les variations somatiques qui peuvent survenir (*fig. 18*).

A. Diversité de la lignée germinale

- Existence de plusieurs gènes V, D, J encodant pour la partie variable ;
- Association au hasard des différents gènes VDJ lors de la recombinaison VDJ ;
- Association au hasard d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère (le site Ac étant partagé par les domaines VH et VL).

B. Génération somatique de la diversité

1. Recombinaison variable

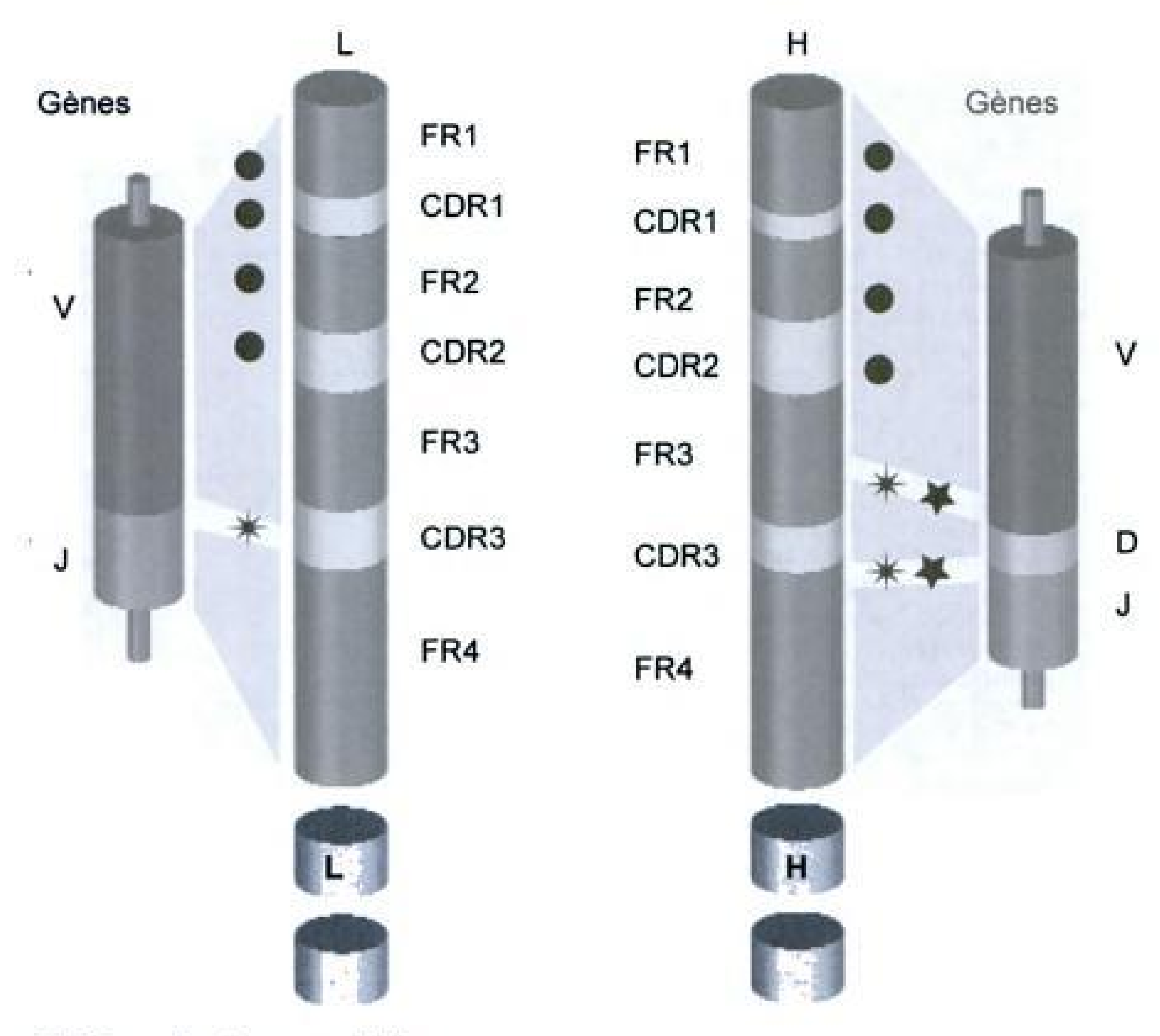
Le siège des recombinaisons entre les gènes V, D et J est imprécis. La coupure n'a pas forcément lieu à la limite du codon terminal de V mais peut être déplacée de 1 ou 2 nucléotides. La diversité de CDR3 est ainsi augmentée. Mais si la jonction des segments géniques conduit à une séquence dénuée de sens, le gène recombiné est abortif.

2. Insertion jonctionnelle

Il existe des bases additionnelles aux jonctions V-D et D-J des chaînes lourdes, non retrouvées dans l'ADN germinal. Elles sont ajoutées par une enzyme, la déxocyribonucléotidyl-tranférase terminale (TdT). Cette diversité jonctionnelle augmente la variabilité de CDR3. Ce mécanisme n'existe que pour les chaînes lourdes.

C. Hypermutations somatiques

Les lymphocytes B mémoires ont subi le dernier réarrangement aboutissant à la commutation de classe, mais sans avoir été transformés en plasmocytes. Les lymphocytes B mémoires prolifèrent. Au cours des divisions, des mutations ponctuelles prennent place dans les gènes VD et J (le réarrangement VDJ s'est produit bien antérieurement). Le taux de mutations spontanées des gènes V est 1 000 fois supérieur à celui des autres gènes. Ces mutations peuvent affecter les codons codant pour le site paratopique et conduire à des Ig d'affinité plus élevée. Des cellules B à Ig de membrane moins avide peuvent aussi en résulter, mais elles meurent par apoptose. Enfin, des recombinaisons somatiques des gènes des chaînes lourdes (commutation de classe) permettent à une cellule B mature de produire différentes chaînes d'isotype différent, mais de même spécificité Ac.



CDR, parties hypervariables
FR, charpente
● Mutations fréquentes
✳ Recombinaison variable, imprécision de la recombinaison
★ Insertion jonctionnelle

Figure 18. Gènes VDJ codant pour les parties hypervariables et les charpentes des Ig. Génération somatique de la diversité

L'essentiel de la question

Structure générale d'une Ig	
2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères identiques 2 à 2 reliées par des ponts disulfures. Chaque chaîne présente :	
Un (chaîne légère) ou plusieurs (chaînes lourdes) domaines constants dont la suite séquentielle d'acides aminés définit la classe et la sous classe d'Ig. Ce fragment Fc est responsable de la fonction biologique de l'Ac : activation du complément, traversée du placenta, fixation sur des récepteurs cellulaires au fragment Fc avec déclenchement phagocytose, libération d'histamine…	Un seul domaine variable dont la suite des acides aminés varie d'une Ig à une autre pour une même sous classe. L'association du domaine variable d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère assure la fixation au déterminant épitopique de l'Ag.

Isotype	Fonctions	Formule	1/2 vie
IgG *12 g/L*	Neutralisation des pathogènes et des toxines +++ Opsonisation des Ag déclenchant leur phagocytose par macrophage et neutrophiles Activation voie classique du complément Cytotoxicyté cellulaire dépendante des Ac (ADCC) pour NK Immunité néonatale, transfert placentaire Inhibition rétroactive des lymphocytes B	Monomère	21 j (IgG3, 7 j)
IgM *1 g/L*	Ac de la réponse primaire Activation voie classique du complément Neutralisation	Pentamère	5 j
IgA *2 g/L*	Immunité des muqueuses, sécrétion dans les lumières digestives et respiratoire Présence dans le lait maternel, protection passive du tube digestif du nouveau-né Neutralisation des toxines et des microbes	Mono, di ou trimère dans le sang Dimère dans les sécrétions	6 j
IgE	Avidement captés à la surface des mastocytes Dégranulation des mastocytes (hypersensibilité immédiate) ADCC par les éosinophiles, défense contre les helminthes	Monomère	2 j
IgD	?	Monomère	3 j

Pour en savoir plus

- Homberg J.-C. *Immunologie fondamentale*. Estem, 1999.
- Janeway C.-A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. *Immunobiology*. Churchill Livingstone, Edimburg, 2001.
- Ballot E., Johanet C. *Les immunoglobulines*. Moniteur Internat, 2001.
- Revillard J.-P. *Immunologie*. De boeck université Bruxelles, 1995.
- Abbas A.-K., Lichtman A.-H. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Elsevier, 2005.

Le complexe majeur d'histocompatibilité chez l'homme

C. JOHANET, E. BALLOT
Laboratoire d'immunologie et d'hématologie, biologiques, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris.

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est un ensemble de gènes localisés sur le bras court du chromosome 6 chez l'homme, à l'origine de molécules exprimées à la membrane des cellules.
Ces molécules jouent un rôle fondamental dans la réponse immune en présentant les peptides (dérivés de diverses protéines de l'organisme ou d'origine étrangère) aux lymphocytes T.
Par ailleurs, ces molécules sont des alloantigènes dont dépend la compatibilité de la greffe de peau et de la transplantation d'organe.
Historiquement, trois découvertes successives permettent de comprendre le CMH :
- *les travaux de Peter Gorer en 1936 sur les greffes de tumeurs chez la souris, qui ont montré que le rejet ou la tolérance de celles-ci étaient génétiquement dépendants. Cela conduisit à la découverte d'un système majeur d'histocompatibilité appelé H2 chez la souris ;*
- *c'est à Jean Dausset que l'on doit la première description chez l'homme, dix-huit ans plus tard (1958). Initialement défini comme un antigène leucocytaire, nommé successivement Hu1 puis HL-A et enfin HLA (human leucocyte antigens), la découverte du CMH de l'homme lui a valu le prix Nobel ;*
- *la fonction du CMH dans la réponse immune n'a été découverte qu'ultérieurement avec les travaux de Doherty et Zinkernagel en 1974. La réponse immune est restreinte au CMH de l'individu.*

L'existence du CMH a été confirmée chez tous les mammifères.

I. Immunogénétique du système HLA

A. Organisation des gènes du système HLA

Le complexe HLA chez l'homme est formé d'environ 200 gènes juxtaposés, placés sur le bras court du chromosome 6, dont seulement une cinquantaine sont connus. Il s'étend sur environ 4 mégabases (1,8 % de recombinaison) mais il existe des gènes en association bien au-delà (HFE par exemple).
Le système HLA est subdivisé en 3 classes (*fig. 1*).
Caractéristiques communes de ces gènes :
- *polymorphisme* très important. Chaque gène est multi-allèlique (sauf HLA-DRA). À chacun des loci correspond un ensemble d'allèles opérationnellement disjoints, mutuellement exclusifs ;
- les allèles sont à *expression codominante*. Chez les hétérozygotes, les 2 allèles sont exprimés ;
- ces gènes sont en liaison étroite les uns avec les autres. Ils se transmettent en bloc sous *forme d'haplotype*.

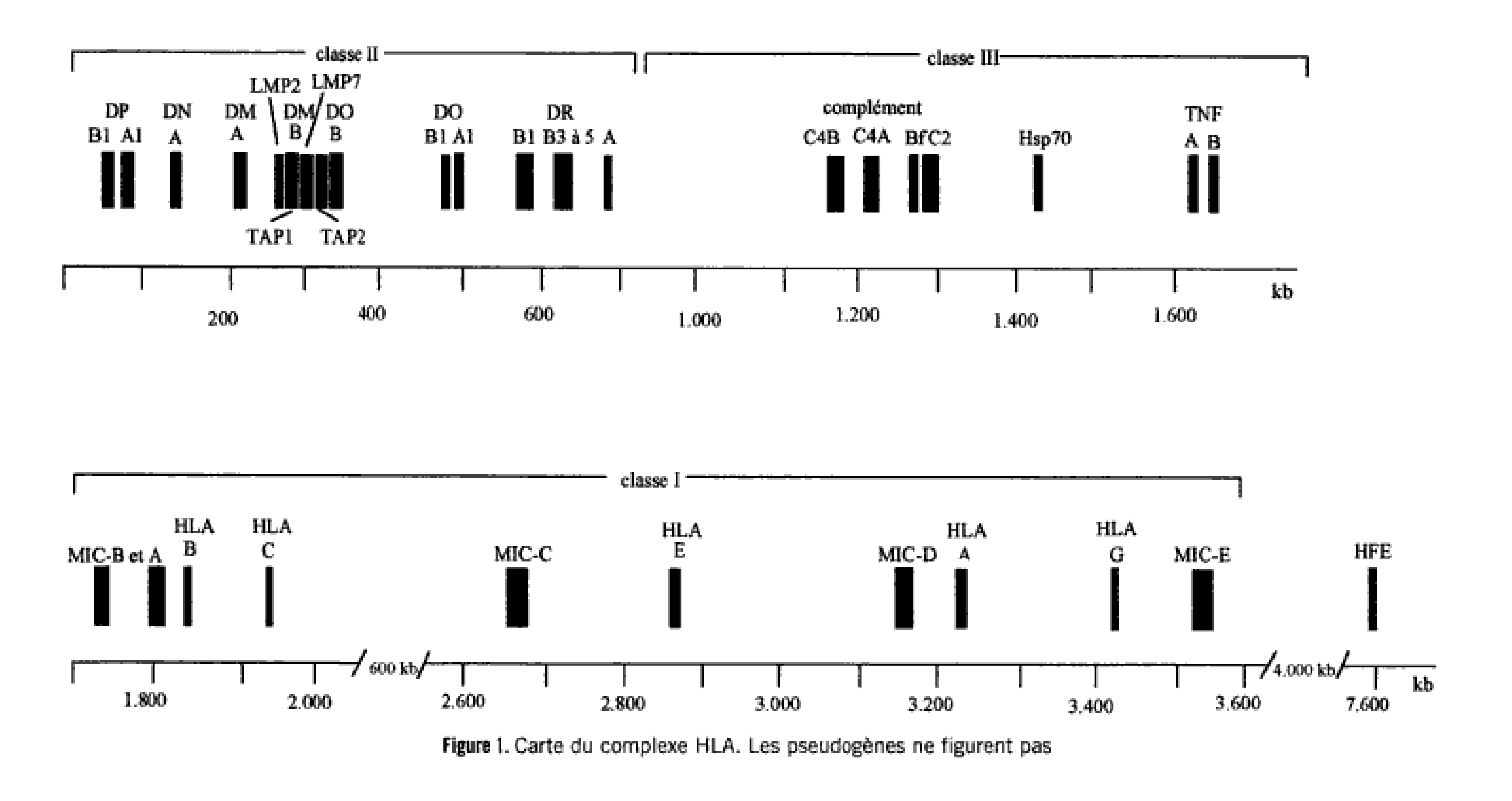


Figure 1. Carte du complexe HLA. Les pseudogènes ne figurent pas

1. Gènes de classe I

- Trois gènes codent pour la chaîne lourde α des molécules HLA de classe I : **HLA-B, HLA-C et HLA-A** (du centromère au télomère) ;
- Il existe d'autres gènes, notamment **HLA-G** qui code pour une molécule exprimée au niveau du placenta, ayant un rôle dans la tolérance de la mère vis-à-vis du fœtus, et **HLA-E** qui code pour une molécule servant de ligand à un récepteur exprimé par les lymphocytes NK (KIR : *killer inhibitory receptors*) ;
- Il existe plusieurs allèles pour chaque locus HLA-A, HLA-B, HLA-C... le polymorphisme est en effet élevé.

2. Gènes de classe II

Les gènes de classe II sont localisés dans la région D du système HLA. Du télomère au centromère, on définit 6 sous-régions **DR, DQ, DO, DM, DN** et **DP**. La grande différence avec les gènes HLA-I est l'existence de 2 sortes de gènes A et B pour chaque sous-région codant respectivement pour les chaînes α et β de la molécule HLA-II.
Le polymorphisme des gènes des chaînes α est variable selon le locus considéré (DRA est monomorphe). Les gènes des chaînes β sont tous polymorphes. Au niveau du locus DR, on trouve un seul gène DRA et un gène DRB1 très polymorphe. Certains individus n'expriment qu'un seul gène DRB alors que d'autres en expriment plusieurs. En fonction des allèles de DRB1 exprimés, DRB3, DRB4 et DRB5 s'expriment aussi.
D'autres gènes sans relation avec le CMH se trouvent dans la même région et interviennent dans l'apprêtement du peptide antigénique. Il s'agit de TAP1, TAP2 (ils codent pour un transporteur de peptides à travers le réticulum endoplasmique), LMP2 et LMP7 (ils codent pour le protéasome qui génère les peptides antigéniques).

3. Gènes de classe III

C'est l'usage qui a consacré ce terme. Les gènes de cette région ne codent pas pour des produits intervenant dans l'histocompatibilité. Ce sont des gènes du complément C2, C4 et Bf ainsi que les 2 gènes de la 21 hydroxylase.
Entre les gènes de classe I et III, on trouve les gènes qui codent pour les TNFα et TNFβ ainsi que le gène de HSP 70 (protéine de choc thermique).

B. Transmission génétique

Chaque individu hérite d'un chromosome, donc d'un *haplotype* de chacun des parents. Il existe ainsi un grand nombre de gènes dans le CMH et un grand polymorphisme de ces gènes : le nombre d'haplotypes différents est très important. Chaque allèle codant pour une protéine différente, les *phénotypes* HLA, c'est-à-dire l'énumération des déterminants portés par l'individu, sont en très grand nombre (plusieurs centaines de milliers). Lorsqu'on connaît la position respective des gènes correspondants sur les 2 chromosomes, on peut écrire le *génotype HLA* de l'individu :

- phénotype A_1 A_9 B_8 B_{12} ;
- génotype A_1 B_8/A_9 B12 ;
- haplotype A_1 B_8 ou A_9 B_{12}.

La *transmission* de ces caractères est autosomique, monofactorielle et dominante. La plupart du temps, la ségrégation des haplotypes parentaux se fait en bloc sans recombinaison entre les loci. Cependant, une fois sur cent, une recombinaison a lieu avec apparition d'un nouvel haplotype. Ces recombinaisons sont plus fréquentes chez la femme que chez l'homme.
Au sein d'une même famille, il y a 4 haplotypes HLA et l'on a, quant au système HLA, 4 types d'enfants possibles :
- HLA identique (25 %) ;
- HLA différent (25 %) ;
- HLA semi-identique (50 %) ;
- HLA recombiné (rare).

Un caractère particulier du système HLA est l'application *d'associations préférentielles* entre les gènes des loci A et B.
Par exemple, les combinaisons de A_1 et B_8 se produisent avec une fréquence de 8,8 % dans les populations humaines, et non à la fréquence théorique de 1,6 %. De telles paires de spécificités sont dites en *déséquilibre de liaison*.
Ces déséquilibres sont des marqueurs utiles car ils sont caractéristiques et différents selon les ethnies.

C. Nomenclature

Celle-ci a été définie en 1976.
De gauche à droite :
- le système génétique HLA ;
- les régions A, B, C, D ;
- la spécificité définie par un numéro.

La première nomenclature utilise le phénotype HLA déterminé par des méthodes sérologiques. La seconde provient du génotype HLA par biologie moléculaire.
Exemple :
- HLA-A2 : spécificité sérologique ;
- HLA-A*02 : détermination générique en ADN ;
- HLA-A*0201 : détermination allèlique.

La dernière référence du comité de nomenclature date de 1998.

II. Biochimie des molécules HLA

Les molécules HLA se rattachent à la superfamille des immunoglobulines par leur structure en domaine.

A. Structure des molécules de classe I

Les molécules de classe I comprennent une chaîne polypeptidique glycosylée de 45 KDa (chaîne lourde) associée de façon non covalente à la β_2 microglobuline qui correspond à la chaîne légère des molécules de classe I (*fig.* 2). Bien que la β_2 microglobuline (β_2M) ne fasse pas partie du site antigénique HLA, elle est indispensable à l'expression des antigènes de classe I.

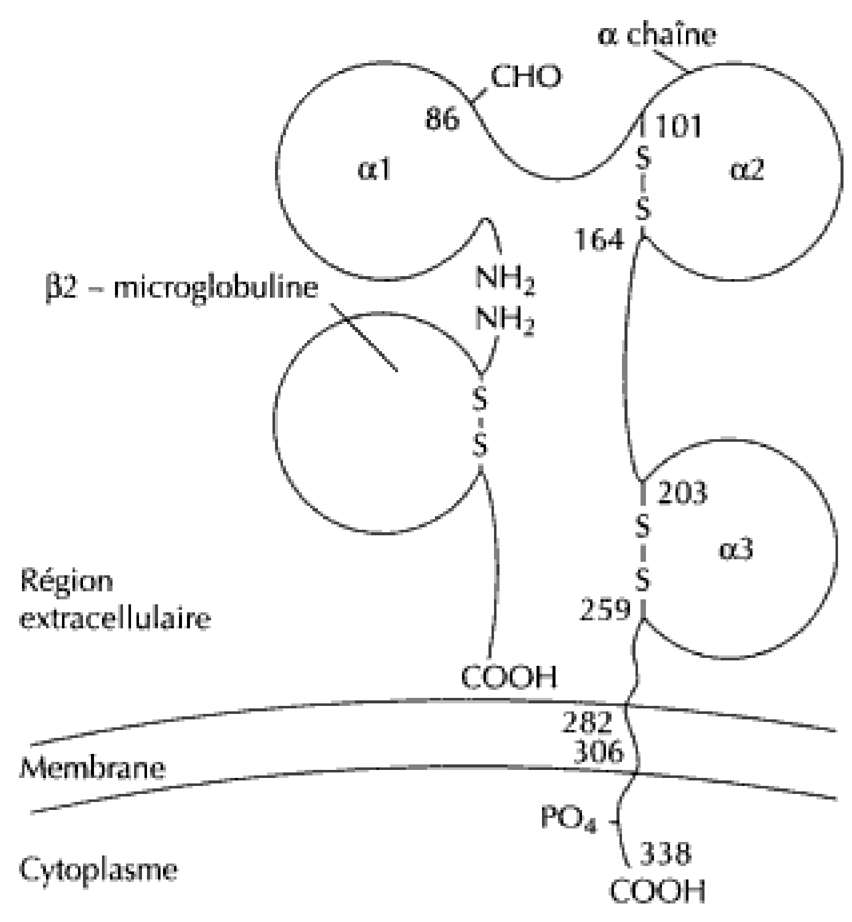


Figure 2. Structure des molécules de classe I

Les 5 domaines de la chaîne lourde codée par le CMH sont représentés : 3 domaines extra-cellulaires α_1, α_2, α_3, 1 domaine intermembranaire et 1 domaine intra-cytoplasmique. La chaîne légère β_2 microglobuline, non codée par le CMH, s'associe de manière non covalente au domaine α_3.

L'analyse de la séquence en acides aminés a montré :

- *une partie extra-cellulaire* avec 3 domaines appelés α_1, α_2, α_3 comprenant environ 90 acides aminés. α_1 est glycosylée et correspond à la partie aminoterminale. Ces 3 domaines sont associés à la β_2 microglobuline.

  Le domaine α_3 et la β_2M ont la même structure qu'un domaine constant d'immunoglobuline (2 feuillets plissés β antiparallèles connectés par un pont disulfure) ; α_1 et α_2 possèdent pour leur part un unique feuillet plissé β surmonté d'une hélice. La structure tridimensionnelle d'un type de molécule de classe I (HLA-A2) a pu être déterminée après une étude cristallographique par diffraction aux rayons X (*fig. 3*). La forme dans l'espace de cette molécule a permis de vérifier l'existence des 3 domaines (α_1, α_2, α_3) associés à la β_2 M (*fig. 3.1*) : HLA-A_2 ménage en son sein une poche dont les dimensions sont suffisantes pour contenir un peptide de 8 à la 10 AA. Le site de liaison de ce peptide se trouve à la partie supérieure de la molécule, tourné vers l'extérieur et donc accessible au site de reconnaissance du récepteur antigénique des cellules T (TCR). Ce site a la forme d'une fente dont le fond est constitué du feuillet β des domaines α_1 et α_2 et les berges de la face interne des 2 hélices (*fig. 3.2*). Les acides aminés impliqués dans l'ancrage du peptide à l'intérieur du site ont pu aussi être mis en évidence (*fig. 3.3*).

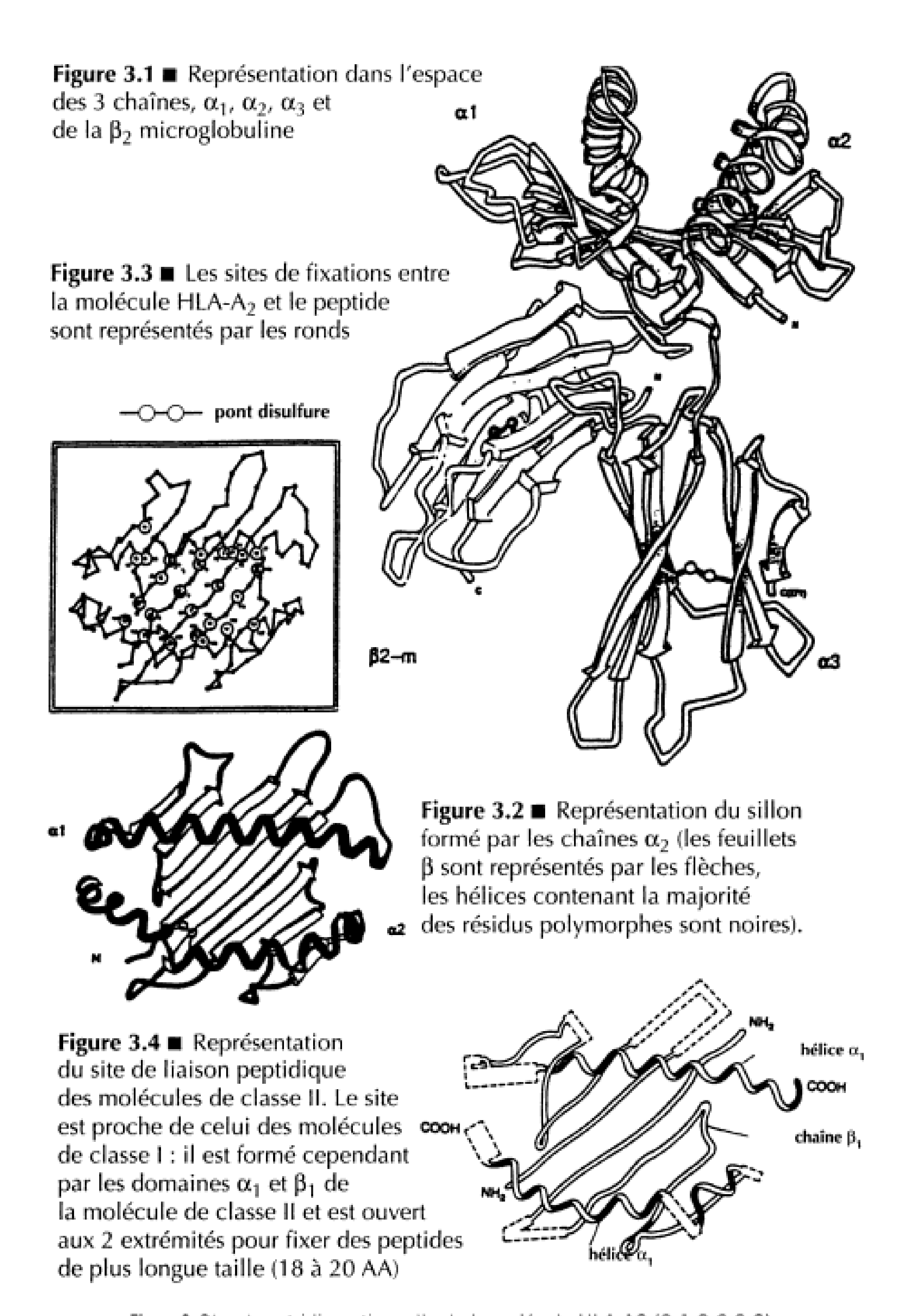


Figure 3.1 ■ Représentation dans l'espace des 3 chaînes, α_1, α_2, α_3 et de la β_2 microglobuline

Figure 3.3 ■ Les sites de fixations entre la molécule HLA-A_2 et le peptide sont représentés par les ronds

Figure 3.2 ■ Représentation du sillon formé par les chaînes α_2 (les feuillets β sont représentés par les flèches, les hélices contenant la majorité des résidus polymorphes sont noires).

Figure 3.4 ■ Représentation du site de liaison peptidique des molécules de classe II. Le site est proche de celui des molécules de classe I : il est formé cependant par les domaines α_1 et β_1 de la molécule de classe II et est ouvert aux 2 extrémités pour fixer des peptides de plus longue taille (18 à 20 AA)

Figure 3. Structure tridimentionnelle de la molécule HLA-A2 (3.1,3.2,3.3). Site de liaison peptidique des molécules de classe II (3.4)

Cette notion de motif d'ancrage permet d'expliquer qu'une même molécule HLA peut lier une très grande variété de peptides aux séquences différentes car les poches conservées aux extrémités du sillon entrent en interaction avec des formes structurales communes à de nombreux peptides, et ne reconnaissent pas l'ensemble des acides aminés eux-mêmes, qui varie d'un peptide à l'autre.

Cependant, selon le phénotype de la molécule HLA, donc selon sa conformation, un peptide déterminé peut être présenté ou non, ou du moins être présenté différemment à un lymphocyte T ;

- *une région transmembranaire* de 25 acides aminés hydrophobes ;
- *un domaine cytoplasmique* carboxyterminal de 30 résidus polaires connecté au cytosquelette.

Des ponts disulfures intracaténaires, notamment dans α_2, α_3 et la présence de la β_2 M stabilisent la molécule.

Les sites alloantigéniques portant les spécificités sont situés sur les domaines α_1 et α_2. Le domaine α_3 est reconnu par la molécule CD8.

B. Structure des molécules de classe II

Les produits des gènes DP, DQ, DR sont des hétérodimères comprenant des chaînes lourdes (α) et des chaînes légères (β) liées par des liaisons non covalentes (*fig. 4*). La masse moléculaire selon le locus d'origine varie de 30 à 40 kDa pour α et de 26 kDa pour β.

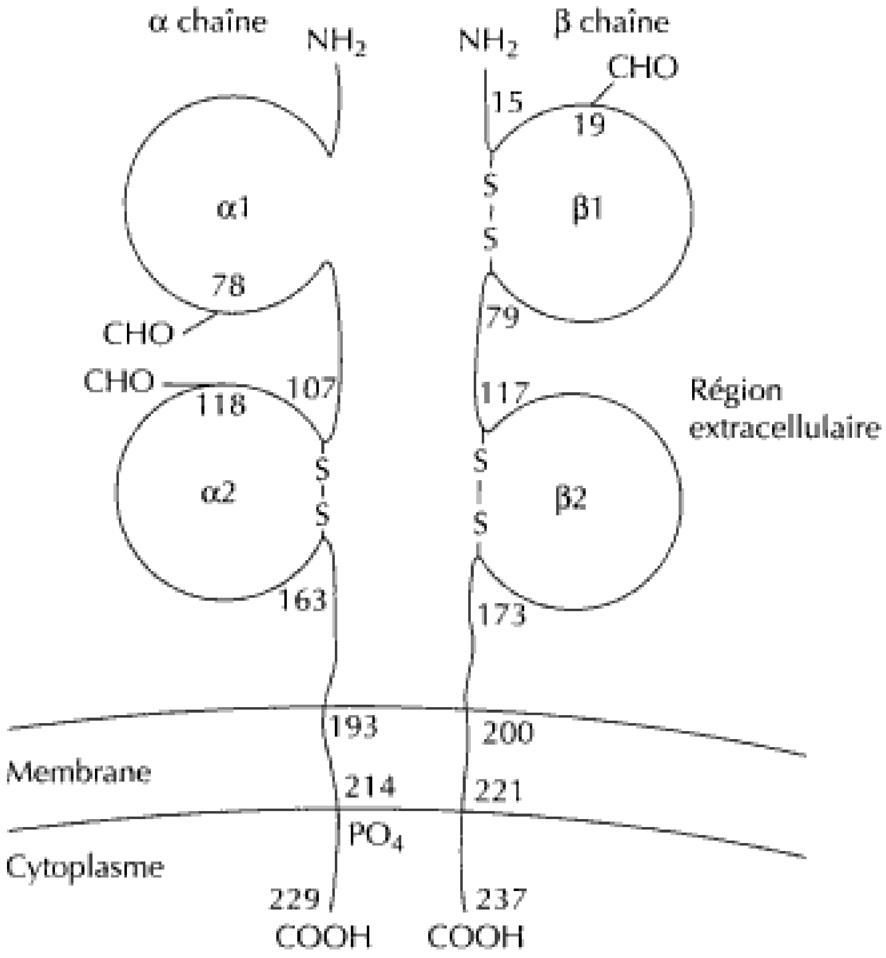
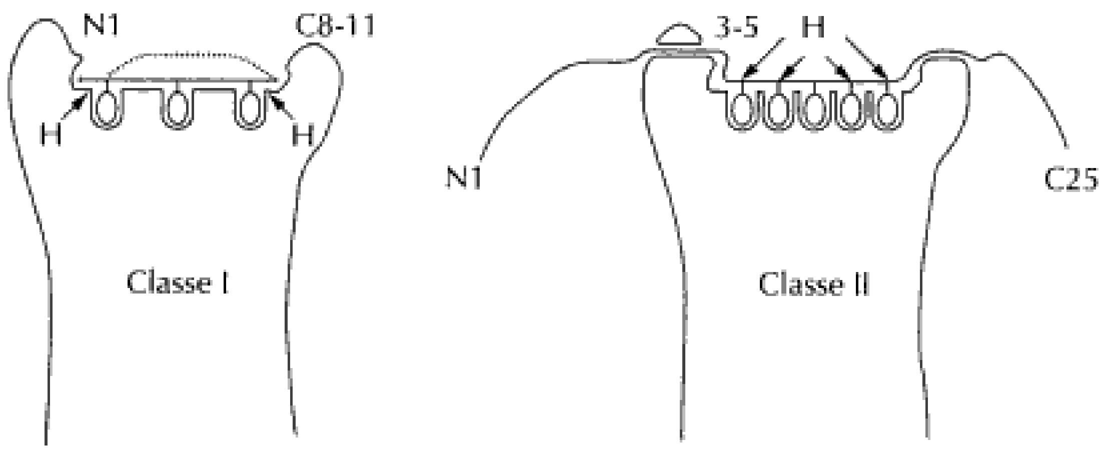


Figure 4. Structure des molécules de classe II

Chaque chaîne comprend :
- 2 domaines extra-cellulaires de 90 acides aminés chacun : α_1, α_2, β_1, β_2 ;
- 1 région transmembranaire de 30 acides aminés ;
- 1 court domaine cytoplasmique.

La structure tridimensionnelle est similaire à celle de la molécule de classe I.
α_1 et β_1 délimitent un sillon ouvert sur ses extrémités, capable de contenir un peptide. La spécificité de l'interaction est définie comme précédemment par la stéréo-complémentarité entre des poches dessinées dans le sillon et des chaînes latérales d'acides aminés du peptide.
À la différence de la classe I, le sillon accepte 15 à 20 acides aminés qui peuvent se chevaucher à l'intérieur de la poche (peptide ± flottant) *(fig. 3.4 et 5)*.
CD4 reconnaît une partie monomorphe du domaine β2.





– Peptide endogène
– Extrémités N- et C-terminales bloquées : ponts hydrogène entre les extrémités du sillon et de la chaîne principale du peptide
– Les peptides de plus de 8 résidus font saillie dans leur partie centrale
– 2 ou 3 chaînes latérales dans des poches du sillon

– Peptide exogène
– Extrémités N- et C-terminales débordent du sillon
– Ponts hydrogène entre chaîne principale des résidus centraux du peptide et résidus conservés du sillon
– 5 chaînes latérales dans des poches du sillon

– Les motifs spécifiques d'allèles se distinguent par les positions relatives des ancrages et les propriétés des chaînes latérales

Figure 5. Sillons et peptides de classe I et de classe II

C. Distribution tissulaire

1. Classe I

Ce sont la plupart des cellules de l'organisme (les GR en sont dépourvus mais les plaquettes, élément également anucléé, en sont riches). Leur densité peut varier selon le type cellulaire. Les lymphocytes expriment 10^4 à 10^5 molécules de classe I par cellule. Les hépatocytes en sont pauvres. Les cellules nerveuses, les spermato-

zoïdes, le placenta (trophoblaste), l'endothélium de la cornée, le pancréas exocrine sont pratiquement dépourvus de classe I.
Le nombre de molécules de classe I varie aussi selon le degré d'activation cellulaire. INF-α, INF-β, TNF-α, TNF-β augmentent l'expression des classes I à la surface cellulaire. Un individu hétérozygote pour HLA-A, B, C porte 6 types différents de molécules de classe I (un homozygote en porte 3).

2. Classe II

La distribution est plus restreinte. Les classes II sont trouvées sur :
- les CPAg :
  - cellules dendritiques,
  - monocytes-macrophages,
  - lymphocytes B ;
- les lymphocytes T après activation ;
- les cellules endothéliales des vaisseaux ;
- les cellules épithéliales de l'intestin grêle.

Elles sont inductibles. Leur expression par des cellules qui ne les expriment pas peut se faire sous l'effet de l'INF-γ, des TNF-α et β, des IL-4, IL-13 et GM-CSF.
Elles peuvent être exprimées dans des circonstances pathologiques, par exemple par les cellules β du pancréas lors des diabètes de type I, par les canaux biliaires lors des cirrhoses biliaires primitives.

III. Assemblage et transport des complexes peptide-CMH

Les molécules de CMH, comme les autres molécules membranaires, sont synthétisées par les polyribosomes. Accrochées au réticulum endoplasmique, elles sont placées au niveau de sa face interne (*fig. 6*).
Les molécules du CMH de classe I lient les peptides alors même qu'elles sont encore au niveau du réticulum. La liaison d'un peptide produit un changement conformationnel facilitant la liaison d'une molécule de β2M. L'association CMH-I β_2M va alors entraîner le transport du complexe vers la surface de la cellule.
Les peptides qui sont associés aux molécules de classe I dérivent tous de la protéolyse partielle de protéines présentes de manière endogène dans le cytoplasme de la cellule présentant l'antigène. La digestion protéolytique est assurée par un complexe multi-enzymatique appelé protéasome, qui comprend LMP-2 et LMP-7. Les peptides produits sont alors captés à l'intérieur du réticulum endoplasmique par des transporteurs actifs spécifiques de ces peptides constitués des protéines TAP1 et TAP2. Le peptide est alors associé au CMH-I.
Les molécules du CMH de classe II vont, pour leur part, être transportées du réticulum endoplasmique à un compartiment endosomal, toujours associées à une protéine appelée chaîne invariante. Cette protéine bloque de façon stérique le site de liaison de la molécule de classe II pendant le transfert.

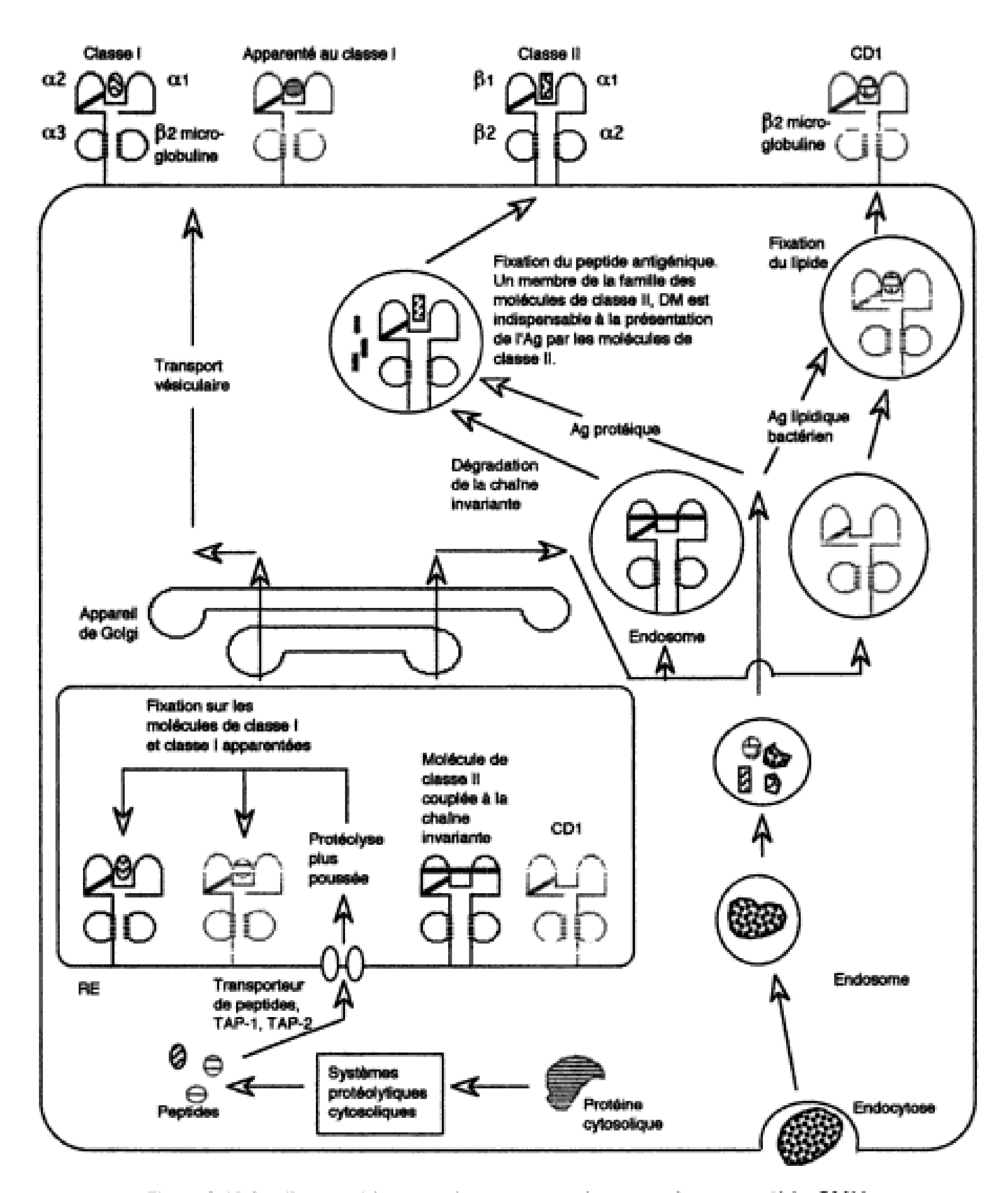


Figure 6. Voie d'assemblage et de transport des complexes peptide-CMH

Au niveau de l'endosome, la chaîne invariante est dégradée et laisse dans le sillon un peptide de dégradation appelé CLIP. L'action catalytique d'une molécule HLA-DM entraîne la libération du CLIP permettant la fixation du peptide antigénique. Le complexe CMH-II peptide subira alors une translocation vers la membrane.
Les antigènes de classe I et de classe II suivent donc, au niveau intracellulaire, des routes différentes et rencontrent l'antigène dans différents compartiments. Si l'antigène est synthétisé de manière endogène et transporté au niveau du réticulum endoplasmique, il sera associé aux molécules de classe I ; en revanche, s'il est internalisé par endocytose et dégradé au niveau endosomal, il sera associé aux molécules de classe II.

IV. Principales fonctions du CMH

A. Rôle du CMH dans la présentation du peptide

Les molécules d'histocompatibilité ont le rôle fondamental de présenter le peptide dégradé à partir de l'antigène aux lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques. La spécificité de la reconnaissance est une réaction à 3 partenaires : la molécule du CMH, le peptide antigénique dégradé et le TCR. D'autres interactions interviennent entre les cellules, en particulier la liaison entre les cellules est renforcée par les interactions LFA1-ICAM1, CD2-LFA3. Des parties monomorphes de la molécule HLA sont reconnues par CD4 (pour les classes II) ou CD8 (pour les classes I).

1. Molécules HLA de classe I

Leur rôle est essentiel dans les réactions qui font intervenir les lymphocytes cytotoxiques CD8+. Les *molécules HLA-1 présentent au TCR des lymphocytes T CD8+, un peptide endogène d'origine virale* ou un autopeptide.
Le lymphocyte T CD8+ n'interagit avec une cellule infectée que s'il reconnaît par son TCR l'antigène viral et le CMH de la cellule (restriction allogénique) (*fig. 7*).
Le TCR est un hétérodimère de chaînes α et β relié par un pont disulfure, chaque chaîne comprenant un domaine constant C et une partie variable V. Les domaines variables Vα et Vβ sont constitués de 2 feuillets plissés β dont les plis sont reliés par des boucles. Trois boucles à l'extrémité de chaque domaine V constituent les trois CDR (*complementary determining region*) qui forment le site de liaison du TCR.
CDR_3 (α et β) se lie au peptide présenté dans le sillon du CMH, alors que CDR_1 (α et β) et CDR_2 (α et β) se lient aux hélices α de la molécule du CMH (ces zones sont très polymorphes et assurent la diversité des restrictions).
La molécule CD8 se lie au CMH au niveau du domaine α_3 renforçant l'adhésion du TCR à son ligand.

2. Molécules HLA de classe II

Les molécules HLA de classe II présentent aux lymphocytes T CD4+ un peptide d'origine exogène issu de protéines antigéniques endocytées et dégradées par la cellule présentatrice d'antigène. Le lymphocyte auxiliaire CD4+ par son TCR reconnaît l'antigène et le CMH. La molécule CD4 complète la reconnaissance par une interaction avec le domaine β_2 du CMH.
Elles interviennent aussi dans les interactions entre lymphocytes B et lymphocytes T auxiliaires (qui conduisent à la formation d'anticorps) de même que dans les interactions entre 2 lymphocytes T auxiliaires CD4+ (qui conduisent à la production de lymphokines).

3. Présentation par des molécules apparentées aux classes I

Ces glycoprotéines membranaires sont structurellement identiques aux molécules de classe I précédemment décrites et avec lesquelles elles présentent un degré élevé d'homologie de séquences. Elles sont cependant moins polymorphes, et le spectre de peptides présentés est plus restreint. Si les gènes qui codent pour ces molécules sont bien connus chez la souris (H2-T, H2-Q, H2-M, H2-M3 et Qa-1), ils sont mal connus chez l'homme, où toutefois le locus HLA-G serait un bon candidat.

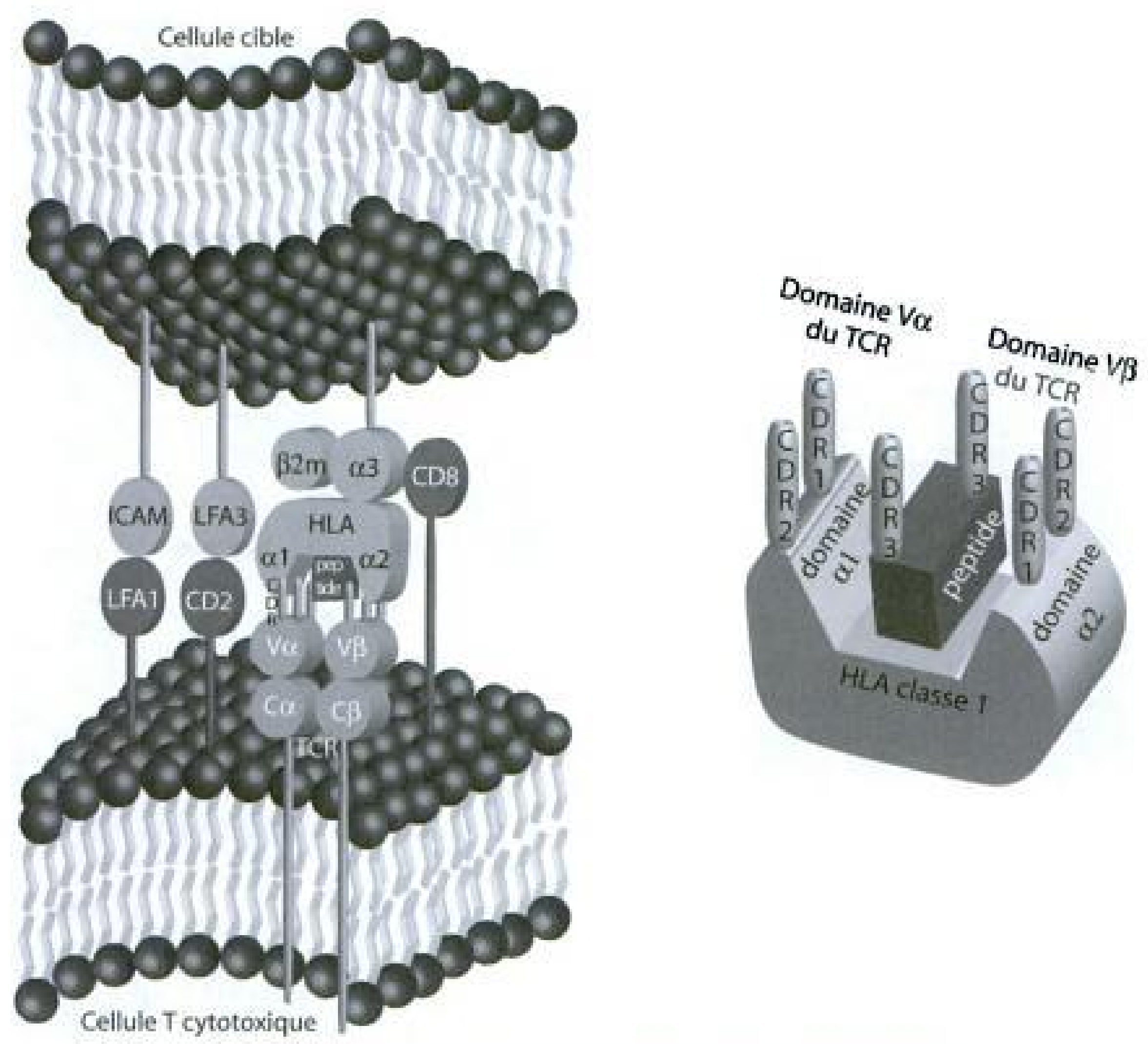


Figure 7. Interaction entre TcR du lymphocyte T cytotoxique et le complexe HLA-1 peptide de la cellule cible

Tableau 1. Propriétés des molécules de classe I et II

	Classe I	Classe II
Locus	HLA-A, HLA-B, HLA-C	DP, DQ DR et autres groupes
Structure des chaînes	Chaîne α + β_2 microglobuline	Chaîne α + chaîne β
Distribution cellulaire	Presque toutes les cellules nucléées	Dendritiques, macrophages, lypho B, lypho T activés
Implication de la présentation à l'Ag aux	T cytotoxiques	T auxiliaires
Source des fragments peptidiques	Protéines faites dans le cytosol (virus)	Membrane plasmique endocytée et protéines extracellulaires
Domaines polymorphes	α_1 et α_2	α_1 et β_1

B. Rôle des molécules HLA-1 dans la cytotoxicité naturelle des cellules NK

Les molécules HLA-1 notamment (HLA-E) protègent les cellules normales de la lyse par les cellules NK (natural killer).

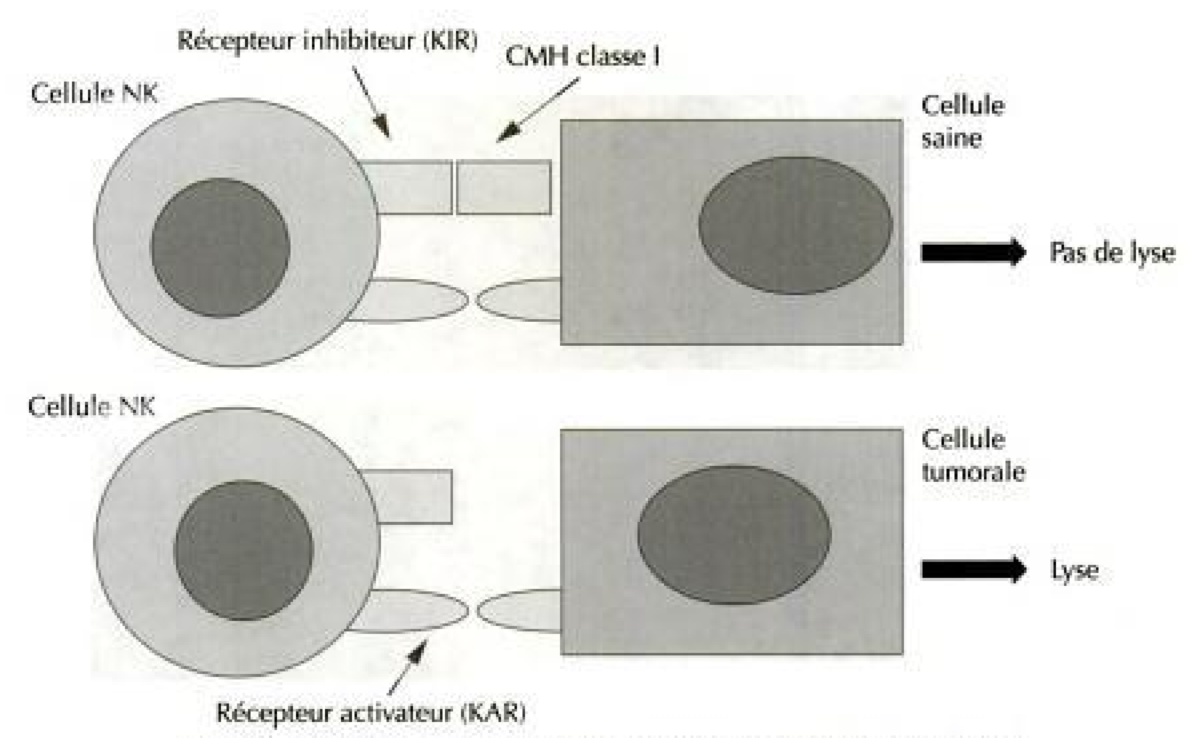


Figure 8. Reconnaissance du CMH de classe I par les cellules NK

En effet, les cellules NK possèdent 2 types de récepteurs : inhibiteur KIR (*killer cell inhibitory receptors*) spécifique des molécules de classe I et réprimant l'activité cytotoxique des cellules NK, et les récepteurs KAR (*killer cell activatory receptors*) qui vont au contraire avoir un rôle stimulant. Les cellules NK sont donc activées par l'absence ou les modifications d'expression des molécules HLA-1 à la surface des cellules cibles. Les cellules tumorales peuvent échapper à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques en diminuant ou en supprimant l'expression des molécules HLA-1 à leur surface. Elles deviennent alors sensibles à la lyse NK (*fig.* 7). Ces anomalies HLA sont présentes dans les 2/3 des tumeurs. Ce phénomène (*fig. 8*), qui constitue un mécanisme classique d'échappement de la tumeur à la surveillance immunitaire, est souvent de mauvais pronostic, favorisant invasion et métastases. De plus, une vaccination antitumorale ne peut être effective et efficace que si les molécules HLA sont exprimées à la surface des cellules tumorales.
HLA-G inhibe les cellules NK maternelles lors de la grossesse normale au niveau du tissu décidual.

C. CMH est impliqué dans la sélection thymique

Le CMH est impliqué dans la sélection thymique des lymphocytes T et dans la génération de leur répertoire.
Des anomalies génétiques peuvent conduire à la non-expression des molécules du CMH. Chez l'homme, l'absence de molécules de classe II induit un déficit immunitaire grave.

D. Maintien du polymorphisme

Il permet une meilleure chance de survie de l'espèce face à des pandémies avec pression sélective.

E. HLA et allo-immunisation

Les molécules HLA sont des alloantigènes qui contrôlent la compatibilité tissulaire.

1. Transplantation d'organe

Le rôle du système HLA dans la réussite des greffes est fondamental. Pour augmenter la survie de l'organe, plusieurs règles doivent être respectées :

- éviter les fortes immunisations préalables dues à de multiples transfusions ;
- éviter les incompatibilités dans la mesure du possible. Les greffes d'organes provenant de jumeaux HLA identiques sont tolérées sans incident. Entre 2 membres d'une même fratrie (donc HLA semi-identique), elles seraient moins bien tolérées, mais d'autant mieux que plus compatibles dans le système HLA ;
- étendre le choix du meilleur receveur à un grand nombre de malades en attente de transplantation (organisations nationales ou internationales de donneurs potentiels : France Transplant, Europe Transplant…) ;
- assurer une immunosuppression efficace en utilisant des agents qui bloquent l'induction ou l'expression d'une réponse immunitaire de l'hôte contre le greffon (ciclosporine…). Selon la greffe à réaliser, on recherchera plus particulièrement telle ou telle compatibilité ;
- pour les greffes de rein : une compatibilité HLA-D a un effet très positif sur la prise de greffe. À long terme (5 années en plus), il est cependant préférable d'avoir une compatibilité HLA-B, voire HLA-A ;
- pour les greffes cardiaques : on recherche une compatibilité DR la plus importante possible (1 seule incompatibilité DR permet 90 % de survie à 3 ans, 2 incompatibilités DR font chuter le taux à 65 %) ;
- pour les greffes hépatiques, le problème de compatibilité est moins aigu car les antigènes du foie transplanté ont tendance à induire un phénomène de facilitation, voire un état de tolérance vraie qui, conjugué à l'emploi d'immunosuppresseurs, empêche les phénomènes de rejet ;
- pour les greffes de la moelle, il est nécessaire d'avoir des donneurs hautement compatibles si l'on veut éviter les réactions du greffon contre l'hôte, dues aux antigènes mineurs d'histocompatibilité. De tels donneurs sont en général trouvés dans la famille du greffé (fratrie notamment). Une compatibilité entre des antigènes différents de ceux contrôlés par les loci HLA semble essentielle ;
- pour les greffes de cornée ou de cartilage, sites privilégiés puisque non vascularisés, les problèmes de compatibilité sont mineurs et l'emploi d'immunosuppresseurs est le plus souvent inutile.

2. Transfusion

Les antigènes HLA, A, -B, -C sont portés non seulement par les leucocytes mais aussi par les plaquettes. Une allo-immunisation antileucocytaire et antiplaquettaire se développe rapidement chez 50 % des malades transfusés et peut entraîner, lors de transfusions HLA incompatibles, des chocs transfusionnels parfois très sévères. Dans certaines affections chroniques où les malades ne peuvent survivre que grâce à la transfusion de leucocytes (aplasie chronique) ou de plaquettes (purpura

thrombopénique idiopathique), on devra réaliser des transfusions HLA compatibles avec le même donneur le plus longtemps possible, le nouveau donneur étant choisi en fonction des anticorps apparus.

3. Grossesse

Une allo-immunisation est fréquente, 10 % après une première grossesse et 30 % chez les multipares. Les conséquences fœtales lors des grossesses ultérieures sont nulles. Cependant, si une greffe ultérieure se produit, le risque de rejet aigu ou suraigu est important. Dans certains avortements à répétition, une déficience de réponse de type tolérance est suggérée.

V. Associations HLA-maladies

La liste des maladies associées au système HLA est longue et les plus connues sont mentionnées dans le *tableau* 2.
Deux types de relation entre HLA et maladies peuvent être distingués :
- si une maladie est due à un seul gène lié à HLA, la transmission génétique est évidente. Dans une famille, il existe plusieurs cas de la même maladie et lorsqu'un malade est typé HLA, tous les autres membres de la même fratrie auront le même HLA. Il s'agit d'une *liaison génétique*. La recherche de cette liaison nécessite une étude *intra-familiale*. La mesure est faite par calcul de *lod score* et test de transmission des haplotypes. Mécanisme : un gène muté, non fonctionnel. Ce cas de figure existe pour l'hémochromatose, le déficit en 21 hydroxylase ou les déficits en facteurs du complément C2 ou C4 ;
- si une maladie est due à plusieurs facteurs environnementaux et génétiques à la fois, une transmission familiale n'est pas claire et seuls des cas isolés sont rapportés. Parfois, la fréquence d'un antigène HLA est accrue parmi une population de malades. On parle alors d'*association génétique*. La recherche de cette association nécessite une *étude de population* (comparaison population malade/population contrôle). On compare les fréquences des marqueurs dans les 2 populations par le *test de* X^2. L'association peut être positive (susceptibilité pour la maladie) ou négative (protection) et se mesure par le risque relatif. Mécanisme : un allèle est en cause dans un contexte donné et remplit mal sa fonction de présentation.

Parmi les associations, nous citerons plus particulièrement :
- spondylarthrite ankylosante avec HLA-B27 ;
- diabète insulinodépendant avec HLA-DR3 et DR4 ;
- polyarthrite rhumatoïde avec HLA-DR1 et DR4 ;
- narcolepsie et HLA-DR2 ;
- enfin, de très nombreuses maladies auto-immunes sont associées à l'haplotype HLA-A1, B8 et DR3.

Tableau 2. Principales associations entre maladies et HLA

HLA	Maladies	Fréquences (%)		RR
		Malades	Témoins	
A1	Maladie de Hodgkin	40	32	1,4
B3	Hémochromatose idiopathique	76	28	8,2
B	Maladie de Behçet	41	10	6,3
	Kératome	28	9	3,9
B12	Sclérose en plaques	18	32	2,2
B14	Déficit en 21-OH à expression tardive	58	4	
B27	Spondylarthrite ankylosante	90	9	87,4
	Syndrome de Reiter	79	9	37,0
	Uvéite antérieure aiguë	52	9	10,4
B35	Thyroïdite subaiguë de De Quervain	70	15	13,7
Bw46	Cancer du nasopharynx	36	23	1,9
Bw47	Déficit en 21-OH à expression précoce	9	1	15,4
Cw6	Psoriasis	87	33	5,4
DR1	Myasthénie induite par D-pénicillamine	63	24	5,4
DR2	Sclérose en plaques	49	26	2,4
	Névrite optique	46	26	2,4
	Syndrome de Goodpasture	88	32	15,9
	Réponse IgE contre l'allergène Ra5	90	31	20,0
	Lèpre tuberculoïde			
	Diabète insulinodépendant	10	30	0,2
DR3	Lupus érythémateux systémique	70	28	5,8
	Maladie cœliaque	79	26	10,8
	Dermatite herpétiforme	85	26	15,4
	Déficit en IgA	81	25	13,0
	Maladie d'Addison	69	26	6,3
	Maladie de Basedow	57	26	3,7
	Thyroïde de Hashimoto	64	34	3,2
	Forme atrophique			
	Myasthénie	50	28	2,5
	Syndrome de Goujerot-Sjögren			
	Glomérulonéphrite extramembraneuse	75	20	12,0
	Hépatite chronique active	37	21	2,2
	Cirrhose biliaire primitive	57	15	7,6
	Forme chronique du syndrome de Guillain Barré	50	17	4,8
	Dermatomyosite juvénile	50	20	3,9
	Diabète insulinodépendant (ID)	56	28	3,3
DR4	Diabète ID	75	32	6,4
	Polyarthrite rhumatoïde	50	19	4,0
	Pemphigus	87	32	14,4
	Maladie de Berger	49	19	4,0
	Lupus induit (hydralazine)	73	33	5,6
DR5	Thyroïde de Hashimoto avec goitre	49	23	5,6
	Anémie de Biermer	25	6	5,4
	Arthrite juvénile	50	16	5,2
	Sida	75	20	12,0
	Sarcome de Kaposi	58	20	5,5
	Leucémie lymphoïde chronique	62	21	6,0
DR7	Syndrome néphrotique de l'enfant	67	31	4,4
	Maladie cœliaque	55	20	4,8
DR8	Arthrite juvénile	23	7	3,6
DQw2	Maladie cœliaque	100	72	38,5
DR3/DR4	Diabète juvénile	32	< 1	47,0
DR3/DR7	Maladie cœliaque	34	1	60,0
DR3/DR4	Syndrome de Sjögren associé au syndrome de Raynaud			

Les fréquences antigéniques parmi les malades et les témoins ainsi que le risque relatif (RR) sont notés, cela correspond au risque encouru par une personne portant l'antigène d'être atteinte par la maladie par rapport au risque d'une personne n'ayant pas cet antigène.

VI. Exploration du complexe HLA

A. Typage HLA

Deux grandes techniques subsistent, le typage sérologique (microlymphocytotoxicité), surtout utilisé pour la classe I, et la biologie moléculaire (classe II).

1. Typage sérologique

La technique de référence est le *test de microlymphocytotoxicité*.
Des alloanticorps anti-HLA de spécificité connue (sérum de multipare, Ac monoclonaux anti-HLA), en présence de complément de lapin, lysent les lymphocytes T (classe I) et B (classe II après avoir éliminé les Ac anticlasse I en les absorbant sur des plaquettes) porteurs des spécificités correspondantes. La lyse cellulaire est appréciée par différentes méthodes différenciant les cellules mortes des cellules vivantes (coloration vitale bleu trypan ou éosine).
La technique est rapide, mais la reconnaissance ne dépasse pas le niveau générique.
Cette méthode est encore employée pour le phénotypage de la classe I.

2. Réaction lymphocytaire mixte

Dans son principe, la réaction lymphocytaire mixte réalise une compatibilité tissulaire *in vitro*. Les lymphocytes de 2 personnes différentes mis en culture ensemble prolifèrent si le phénotype HLA-II est différent.

a) Culture lymphocytaire mixte unidirectionnelle (MLR)

Les lymphocytes de 2 sujets, différents génétiquement au niveau du locus et mis en culture, vont se stimuler mutuellement. Cette stimulation se traduit par une transformation lymphoblastique et une prolifération. L'incorporation d'un précurseur radioactif de l'ADN comme la thymidine tritiée permet de mesurer la prolifération après 5 ou 7 jours de culture. La réaction est dite unidirectionnelle, puisque les cellules lymphocytaires stimulantes (l'autre population de lymphocytes est appelée répondante) sont bloquées par traitement antimitotique (mitomycine) ou par irradiation mais doivent rester vivantes pour stimuler la population lymphocytaire étrangère répondante.
Classiquement, on utilise des cellules homozygotes HLA-D comme cellules stimulantes et les lymphocytes du sujet à typer comme cellules répondantes (il existe toute une batterie de cellules homozygotes porteuses dans différentes spécificités HLA-D connues). Il y a réponse de typage lorsque la MLR est négative, les 2 cellules en présence ont un déterminant HLA-D commun.

b) Culture lymphocytaire mixte secondaire ou *primed lymphocyte typing* (PLT)

Cette technique repose sur la propriété qu'ont les lymphocytes sensibilisés *in vitro* une première fois en MLR de développer une réponse proliférative de type secondaire lorsqu'ils sont réexposés aux mêmes stimulants. Ce test est plus rapide que la MLR classique puisque l'incorporation de thymidine est mesurée au bout de

24 heures. À la différence de la MLR, ce sont les cellules induites *in vitro* qui reconnaissent et répondent aux alloantigènes du sujet à traiter. Les cellules lymphocytaires préalablement induites sont congelées avant la PLT.

3. Typage par biologie moléculaire (BM)

Le typage par BM est de plus en plus répandu et permet une détermination au niveau allèlique, générique ou spécifique. Plusieurs techniques existent, toutes passent par une étape préalable, la PCR, qui permet d'amplifier la région que l'on veut étudier.

a) PCR-SSO ou PCR-SSO *reverse* (*sequence specific oligonucleotide*)

La PCR-SSO consiste à amplifier la région de l'ADN génomique qui présente un polymorphisme d'intérêt. Les amorces choisies sont localisées dans des régions hautement conservées encadrant la zone polymorphe. La séquence copiée est hybridée avec des sondes couvrant toutes les régions informatives.
Dans le cas de la PCR-SSO *reverse*, ce sont les sondes oligonucléotidiques qui sont fixées sur un support solide puis hybridées avec le produit d'amplification. Le support solide peut être une bandelette de membrane ou une plaque Elisa.

b) PCR-SSP (*sequence specific primer*)

La PCR-SSP désigne une amplification basée sur l'utilisation d'amorces localisées dans les régions polymorphes de façon à permettre une amplification spécifique d'un allèle ou d'un groupe d'allèles.

c) Typage HLA par séquençage ou PCR-SBT (*sequence based typing*)

Il consiste à séquencer directement la région polymorphe du gène HLA obtenue par PCR.
Étant donné le haut degré de polymorphisme du système HLA, 2 niveaux de résolution ont été définis : le typage générique qui a le même degré de définition que le typage sérologique et le typage spécifique qui correspond à la définition allèlique des gènes.
Les indications du typage générique sont : donneur et receveur de transplantation d'organe, association HLA-maladie (le plus souvent), le typage spécifique est utilisé pour les donneurs et les receveurs de greffe de moelle entre sujets non apparentés, les études anthropologiques et quelquefois dans les associations HLA-maladie.

B. Détection des anticorps anti-HLA

1. Microlymphocytotoxicité

Cette recherche d'alloanticorps anti-HLA s'effectue par microlymphocytotoxicité à partir d'une batterie de suspension lymphocytaire de spécificité antigénique connue. Le test est sensibilisé par l'utilisation d'une antiglobuline anti-kappa.

2. Elisa

Ce test plus sensible permet d'éviter d'entretenir un panel de cellules.

3. Cytométrie de flux

Très sensible.

4. Cross-match (détection d'anticorps anti-HLA chez les futurs receveurs)

Épreuve de compatibilité directe effectuée avant la transplantation.
Le *cross-match* fait intervenir le sérum du receveur et les cellules du donneur.
Certains anticorps HLA sont nocifs pour le greffon, s'ils reconnaissent l'antigène cible, interdisant la greffe sous peine de rejet hyper-aigu. Mais le *cross-match* doit tenir compte du choix de la technique : cytométrie, microlymphocytotoxicité, de la cible B ou T, de la classe de l'anticorps IgG ou IgM, de la classe de l'antigène reconnu I ou II.

L'essentiel de la question

Ensemble de gènes localisés sur le bras court du chromosome 6 chez l'homme, à l'origine des molécules du CMH exprimées à la membrane des cellules.

CMH de classe I : HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G
Série de gènes uniques pour chaque variété de HLA à l'origine de la chaîne lourde α associée à la $\beta 2$ microglobuline, chaîne légère provenant d'un gène situé sur le chromosome 15.
Les molécules HLA-1 présentent au TCR des lymphocytes T CD8, un peptide endogène d'origine virale ou un auto-peptide. La poche formée par les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, porteuse du polymorphisme, reçoit le peptide cytosolique. La molécule CD8 se lie au CMH au niveau du domaine $\alpha 3$. Les lymphocytes T cytotoxiques peuvent surveiller toutes les cellules de l'organisme en raison de la quasi-ubiquité du HLA-1.
Les molécules HLA-1, notamment HLA-E, protègent les cellules normales de la lyse par les cellules NK.

CMH de classe II : HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ
Comprend un gène A et un gène B à l'origine de l'hétérodimère $\alpha\beta$.
Les molécules HLA-2 présentent aux lymphocytes T CD4 un peptide d'origine exogène issu de protéines antigéniques endocytées et dégradées par la cellule présentatrice d'antigène. Le HLA-2 n'est présent, mis à part quelques exceptions, que sur ces cellules présentatrices d'antigène. La poche recevant le peptide exogène est formée des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ polymorphes, la molécule CD4 se lie au domaine monomorphe $\beta 2$ du CMH.

Dans les domaines de la transfusion ou de la greffe d'organe, les molécules HLA de classe I ou II peuvent être à l'origine d'allo-immunisation ou de rejet. Enfin la **relation HLA et maladie** peut être due à une association demandant une étude intra-familiale ou à une liaison traduisant un risque relatif entre sujets atteints et sujets normaux de la même population.

Pour en savoir plus

- Bjorkman P.-J., Saper M.-A., Sanraoui B. *et al.* Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature*, 1987 ; 329 : 506-12.
- Charron D. *Genetic diversity of HLA, functional and medical implication*. EDK, 1997.
- Colombani J. *HLA : fonctions immunitaires et applications médicales*. John Libbey, Paris, 1993.
- Gould D.-S., Auchincloss H.-J. Direct and indirect recognition : the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today*, 1999 ; 20 : 77-82.
- Homberg J.-C. *Immunologie fondamentale*. Estem, 1999.
- Janeway C.-A., Travers P. Immunologie. De boeck université, Bruxelles, 1997.
- Klein J., Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*, 2000 ; 343 : 702-9.
- Klein J., Sato A. The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med*, 2000 ; 343 : 782-86.
- Revillard J.-P. *Immunologie*. De boeck université, 3e éd., Bruxelles, 1998.
- Abbas A.-K., Lichtman A.-H. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Elsevier, 2005.

Réponses immunitaires humorale et cellulaire et leur régulation

M. ROSENZWAJG, Service de Biothérapies, UPMC CNRS UMR7087, groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris.

La question d'Internat a pour titre : « Réponses immunitaires humorale et cellulaire et leur régulation. » Compte tenu de l'étendue des connaissances disponibles à l'heure actuelle sur ce sujet, il n'est pas possible de le traiter de manière exhaustive sans traiter l'immunologie dans son ensemble. Nous avons donc conservé la séparation en immunité humorale et immunité cellulaire bien que ces deux mécanismes soient intimement liés.
La première partie traite de l'immunité à médiation humorale et de sa régulation, la seconde de l'immunité à médiation cellulaire. Il est indispensable de bien connaître la biosynthèse et les fonctions des immunoglobulines avant d'entreprendre une étude approfondie de cette question.
Après introduction d'un antigène dans l'organisme, il y a reconnaissance de celui-ci par les cellules du système immunitaire. La réponse immune spécifique, comme la production d'anticorps contre un pathogène, est appelée réponse immune adaptative car elle apparaît au cours de la vie en réponse à une infection par un pathogène. Elle confère de plus très souvent une immunité protectrice (mémoire) contre la réinfection par le même pathogène. Définissant l'immunité humorale transférable passivement par le sérum d'un animal immunisé, la réponse anticorps représente l'une des modalités de la réponse immune adaptative. Cette réponse est le plus souvent soumise à une régulation très complexe secondaire à des interactions cellulaires entre lymphocytes T et cellules présentatrices d'antigènes (lymphocytes B, cellules dendritiques, macrophages) ; elle peut soit rester isolée, soit s'associer à une réponse à médiation cellulaire.

I. Physiologie de l'immunité à médiation humorale

A. Ontogénie des cellules B

Avant la naissance, les lymphocytes B sont produits au niveau du foie fœtal ; après la naissance, les lymphocytes B sont produits dans la moelle osseuse.
La différenciation des lymphocytes B se déroule en plusieurs phases :
- La différenciation de la lignée B, à partir de la cellule souche hématopoïétique, a lieu dans la moelle osseuse en l'absence de toute stimulation antigénique. Le premier stade de différenciation conduit à la formation de cellules proB. Les cellules proB apparaissent avant que le réarrangement des gènes des immunoglobulines (Ig) ne commence et sont identifiées par l'expression de molécules de surface spécifiques de la lignée B (*tableau 1*). Les stades suivants sont définis par le réarrangement séquentiel des gènes des Ig et par les modifications d'expression des marqueurs de surface. Le réarrangement des chaînes lourdes des Ig commence au stade proB et se termine au stade préB, des chaînes lourdes μ intra-cytoplasmiques peuvent alors être détectées. Les gènes des chaînes légères sont ensuite réarrangés, ce qui conduit à l'expression de molécules d'IgM à la surface de cellules B immatures. Les lymphocytes B immatures se différencient en cellules B matures qui expriment à leur surface des IgM et des IgD. La différenciation des lymphocytes B est finement contrôlée par les cellules du microenvironnement médullaires et par les cytokines produites localement (IL-7).

- Le développement des cellules B dépend donc du réarrangement séquentiel réussi de leurs gènes des chaînes lourdes et légères des Ig. Ces différentes étapes sont médiées par un complexe enzymatique appelé *recombinase* spécifique des cellules lymphocytaires qui comprend des enzymes de clivage et de réparation de l'ADN.

Pour la synthèse des chaînes lourdes (H) et légères (L), un seul des deux chromosomes homologues est exprimé : c'est le phénomène d'exclusion allélique ou d'haploïdie fonctionnelle (on trouve sur un lymphocyte B une chaîne κ ou une chaîne λ mais jamais les deux à la fois). Les cellules ayant un réarrangement génétique non fonctionnel ou les cellules ayant une forte affinité pour des antigènes du soi mourront par apoptose (délétion clonale).

B. Hétérogénéité des cellules B

Au cours de leur différenciation, les cellules B acquièrent l'expression des molécules de classe II du CMH et des molécules CD19, CD20, CD21, CD22 et CD72 alors que les molécules CD10 et CD38 ne sont exprimées qu'aux stades proB et préB ou par certaines cellules des centres germinatifs (*tableau 1*). Depuis leurs premières étapes de différenciation dans la moelle osseuse jusqu'à leur migration dans les organes lymphoïdes, les lymphocytes B constituent un ensemble hétérogène de cellules, tant par leur morphologie que par leur localisation anatomique ou les molécules qu'elles expriment à leur surface. Cette hétérogénéité résulte de ce que la maturation des lymphocytes B se déroule en périphérie après stimulation antigénique.

Tableau 1. Développement des lymphocytes B

	Progéniteur des cellules B	Cellule proB	Cellule préB	Cellule B immature	Cellule B mature
Gènes des Ig	VH et VL Configuration germinale	VH réarrangé	VH transcrit VL réarrangé	VH et VL réarrangés et transcrits	VH et VL réarrangés et transcrits
Expression des Ig	Absente	Absente	μ intra-cytoplasmique	IgM exprimées à la surface	IgM et IgD exprimées à la surface
Marqueurs exprimés	CD19 CD10 CD38 CMH II	CD19 CD38 CD40 CMH II	CD19 CD20 CD38 CD40 CMH II	CD19 CD20 CD21 CD40 CMH II	CD19 CD20 CD21 CD40 CMH II

Les lymphocytes B matures ayant la morphologie d'un petit lymphocyte en phase G0 du cycle quittent la moelle et gagnent les organes lymphoïdes secondaires. Dans les organes lymphoïdes secondaires, les cellules B sont localisées dans des follicules qui contiennent également des cellules stromales et des cellules folliculaires dendritiques. Les cellules B y reçoivent des signaux de survie et quittent le follicule par les lymphatiques efférents pour rejoindre la circulation. Les cellules B circulent ainsi à travers les organes lymphoïdes jusqu'à ce qu'elles rencontrent l'antigène.

C. Récepteur des cellules B et les anticorps solubles

Les anticorps sont constitués de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères identiques qui sont liées par des ponts dissulfures. La partie amino-terminale de chaque chaîne contient un domaine variable qui se lie à l'antigène grâce à trois régions hypervariables (CDR). La partie carboxy-terminale de chaque chaîne forme une région constante qui définit la classe et la sous-classe de l'Ig et détermine la nature de la chaîne légère κ ou λ (*fig. 1*). La séquence des acides aminés de la région constante des chaînes lourdes permet de différencier 5 classes d'immunoglobulines ou isotypes (IgG, IgA, IgM, IgD et IgE), 4 sous-classes d'IgG, et 2 sous-classes d'IgA. Ces différentes classes et sous-classes ont des fonctions différentes, elles sont soit produites comme des Ig solubles soit comme des Ig de membrane. Les Ig de surface possèdent en plus une séquence hydrophobe transmembranaire qui permet l'ancrage de la molécule à la surface des cellules B. Les IgA sécrétoires sont présentes à la surface des muqueuses sous forme de dimères et les IgM circulantes sous forme de pentamères. Ces IgA et IgM multimériques sont stabilisées par un peptide (pièce J) et les IgA sécrétoires présentent également une pièce sécrétoire qui les protège de l'activité protéolytique du tractus gastro-intestinal.

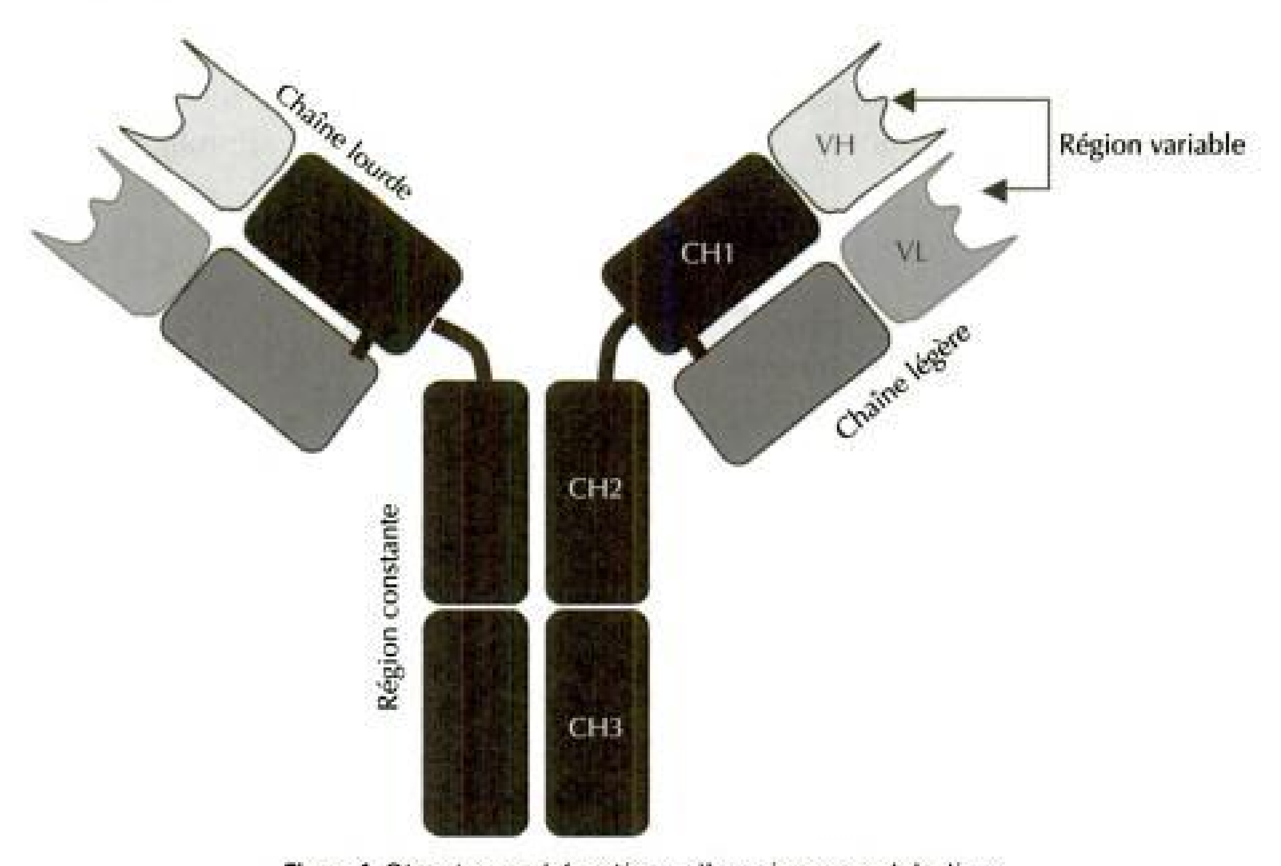


Figure 1. Structure schématique d'une immunoglobuline

D. Caractères généraux de la réponse humorale

Beaucoup de bactéries pathogènes pour l'homme se multiplient dans les espaces extracellulaires, les pathogènes intracellulaires doivent quant à eux aller de cellules à cellules en passant par les liquides extracellulaires. La réponse immune

humorale permet la destruction des pathogènes extracellulaires *(opsonisation et activation du complément)* et limite le développement des infections intracellulaires *(neutralisation)*.
Ainsi, la production d'Ig spécifiques d'un antigène par les lymphocytes B au cours d'une infection est la contribution principale de ces cellules dans l'immunité adaptative. Les lymphocytes B, présents chez un individu non immunisé sous forme de cellules quiescentes, prolifèrent et se différencient après sélection spécifique par l'antigène en donnant naissance à des cellules productrices d'anticorps (expansion clonale). Si le lymphocyte B est directement responsable de la production d'anticorps, cette dernière dans le cas général fait intervenir de nombreuses interactions cellulaires.
La réponse immunitaire humorale présente plusieurs caractéristiques :
- elle est spécifique : un anticorps produit en réponse à un antigène donné réagit spécifiquement avec cet antigène ;
- elle est polyclonale : un antigène induit la prolifération et la différenciation de clones lymphocytaires B produisant des anticorps de spécificités différentes correspondant à différents épitopes de la molécule. Pour un même épitope, les anticorps synthétisés diffèrent par leur affinité, leur taux de sécrétion, leur isotype et leur spécificité idiotypique.

Le premier contact d'un organisme avec un antigène va induire, si la molécule est immunogène, une réponse antigénique primaire. Un contact ultérieur avec le même antigène induit une réponse antigénique secondaire qui présente des caractères très différents de la réponse primaire (*fig.* 2).

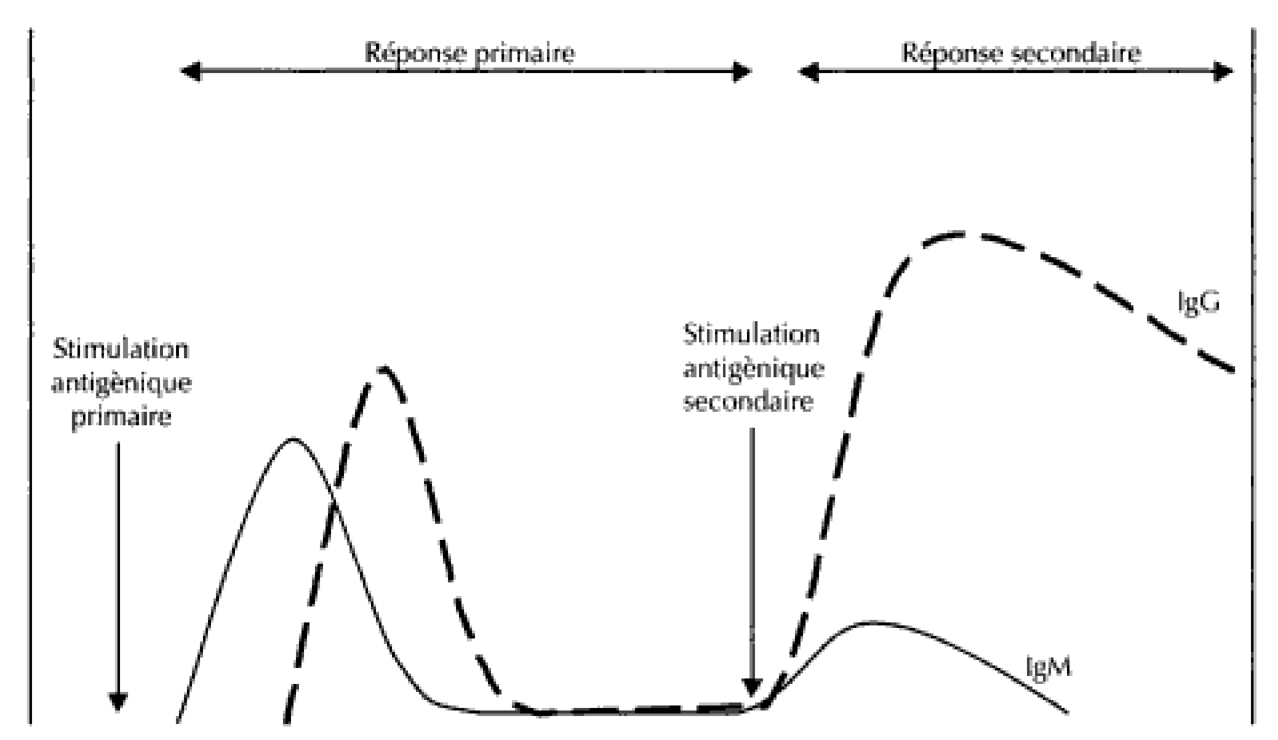


Figure 2. Réponse anticorps primaire et secondaire

1. Réponse primaire

L'évolution de la quantité (titre) d'anticorps fait apparaître trois périodes (*fig.* 2) :
- la période de latence est brève (3 à 4 heures) et varie selon la nature de l'antigène ;

- les premiers anticorps apparaissent pendant la phase de croissance et leur taux augmente de façon exponentielle. Le temps de doublement de la concentration d'anticorps varie non seulement avec la nature de l'antigène mais aussi avec le caractère bon ou mauvais producteur d'anticorps de l'animal. Cette phase est suivie d'un plateau de quelques jours où le taux d'anticorps se stabilise à un niveau élevé ;
- la troisième période est la phase de décroissance qui reflète d'une part la diminution de production des anticorps et d'autre part, le catabolisme des immunoglobulines. Parallèlement à cette courbe en cloche pour les anticorps spécifiques, les immunoglobulines totales circulantes augmentent. La réponse anticorps est donc associée à une production d'immunoglobulines *non spécifiques*.

La nature de l'isotype varie généralement au cours de la réponse primaire. Les premiers anticorps produits sont des IgM qui sont progressivement remplacées par des IgG. Contrairement à celle des IgM, l'affinité des IgG augmente considérablement avec le temps. La spécificité des anticorps produits évolue également. Les déterminants antigéniques immunodominants induisent de manière préférentielle les anticorps correspondants puis les autres spécificités peuvent se démasquer par la suite. L'hétérogénéité des anticorps produits vis-à-vis d'un même déterminant dépend de la dose d'antigène présente (les faibles doses immunogènes favorisent les réponses homogènes).

2. Réponse secondaire

Une seconde administration du même antigène entraînera une réponse secondaire qui présente des caractéristiques différentes de la précédente ; la période de latence est raccourcie, permet d'atteindre un plateau plus élevé, la phase de décroissance est allongée et les anticorps peuvent persister à un taux détectable plusieurs mois, voire plusieurs années (*fig. 2*).

La production IgM est très transitoire et les autres isotypes prédominent. L'affinité des anticorps est très augmentée et l'hétérogénéité plus restreinte (cette particularité justifie les injections de rappel lors des vaccinations et l'hyperimmunisation indispensable pour la production d'antisérums).

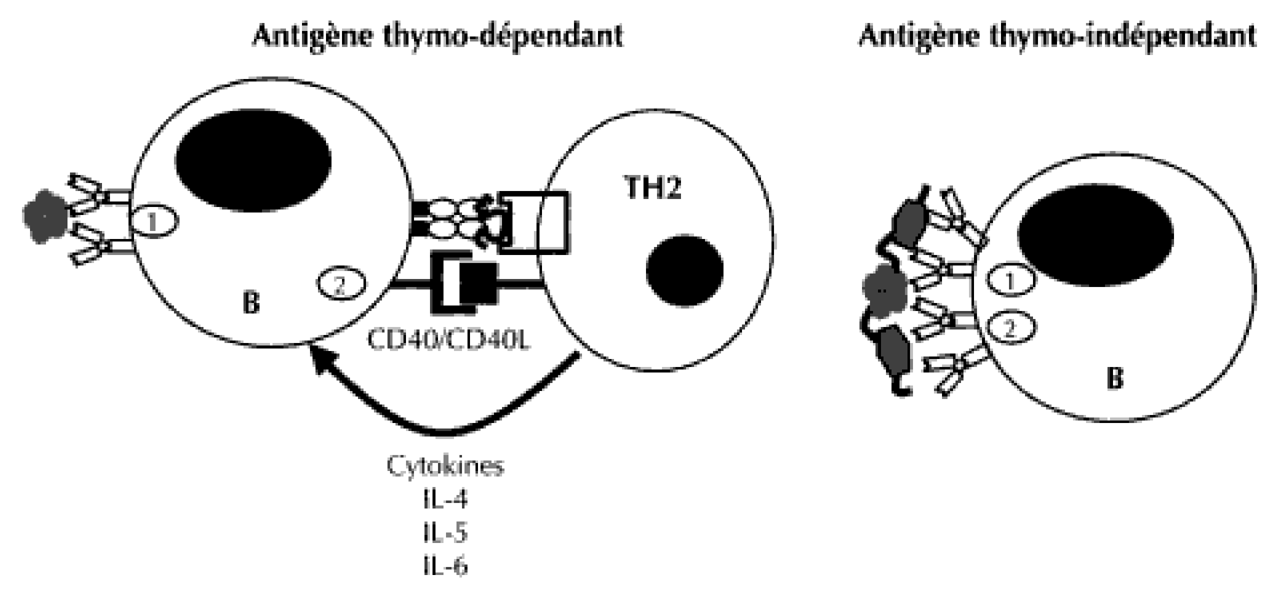
Les caractères particuliers de la réponse secondaire vis-à-vis d'un antigène mettent donc en évidence l'existence d'une mémoire immunologique. Cette mémoire est due aux lymphocytes, il est possible de transférer passivement une réponse de type secondaire à un receveur non immunisé en lui injectant des lymphocytes de donneur immunisé, puis en lui administrant l'antigène.

E. Nature de la réponse anticorps selon l'antigène

1. Antigènes thymo-dépendants

L'Ig de surface qui sert de récepteur pour l'antigène joue un double rôle dans l'activation des lymphocytes B. Après fixation de l'antigène, elle transmet un signal direct à l'intérieur de la cellule. Elle permet également la captation de l'antigène et son internalisation dans le compartiment endosomal où il est dégradé en peptide

puis renvoyé à la surface, associé aux molécules de classe II du CMH. Le complexe CMH/peptide pourra être reconnu par des lymphocytes T spécifiques qui à leur tour provoquent la prolifération et la différenciation de ces mêmes lymphocytes B (*fig.* 3). Les expériences de thymectomie à la naissance entraînent un déficit de la réponse anticorps pour certains antigènes appelés *thymo-dépendants*. Le rôle des lymphocytes T auxiliaires dans la réponse anticorps est donc essentiellement de permettre la différenciation des lymphocytes B en cellules productrices d'anticorps. Les antigènes thymo-dépendants sont en général de nature protéique. La réponse anticorps primaire est de type IgM ; la réponse secondaire survient de manière précoce et avec une intensité plus élevée que la réponse primaire. La maturation de la réponse se traduit par le passage aux IgG avec augmentation d'affinité.



Le premier signal requis pour l'activation des cellules B est délivré par le récepteur pour l'antigène. Dans le cas d'antigène thymo-dépendant, le second signal est délivré par la cellule TH2. Dans le cas d'antigène thymo-indépendant, le second signal est délivré par l'antigène lui-même.

Figure 3. Un second signal est nécessaire pour l'activation des cellules B

2. Antigènes thymo-indépendants

Certains constituants microbiens peuvent induire la production d'anticorps par les lymphocytes B sans coopération des cellules T, ce qui permet une production rapide d'anticorps contre de nombreux pathogènes. Ces antigènes microbiens sont dits *thymo-indépendants* (*fig.* 3). Par définition, ceux-ci entraînent une réponse anticorps chez les animaux thymectomisés ou chez la souris *nude*. Il s'agit de grosses molécules de structure polymérique et répétitive (polyosides, dextrans, lévanes, lipopolysaccharides, endotoxines, polymères synthétiques…). La réponse anticorps à ce type d'antigène est, en règle générale, de type IgM avec des anticorps d'affinité relativement faible et constante. Les anticorps thymo-indépendants n'induisent pas de réponse secondaire. À très fortes concentrations, certains sont capables d'activer d'autres clones cellulaires que ceux qui leur sont spécifiques (activation polyclonale).

F. Production d'anticorps par les lymphocytes B et sa régulation

Activation du lymphocyte B par l'antigène et coopération B-T

L'activation de cellules B pour des antigènes protéiques (thymo-dépendants) et leur différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps sont initiées par l'antigène, mais nécessitent la collaboration de cellules T CD4 auxiliaires. C'est dans les organes lymphoïdes secondaires qu'ont lieu ces interactions cellulaires. La fixation de l'antigène à son récepteur (BCR = Ig + CD79a et CD79b) induit de nombreux signaux intracellulaires qui permettent aux lymphocytes B dont la majorité est à l'état quiescent de rentrer en cycle. Les lymphocytes B activés passent en phase G1 puis S/G2 et M et prolifèrent. Après une série de mitoses, le clone cellulaire généré se différencie et va être capable de produire des Ig spécifiques de l'antigène.

La reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte B permet également l'internalisation du complexe BCR-Ag, sa dégradation dans la voie endosomale en peptides qui seront exprimés à la membrane, associés aux molécules de classe II du CMH. Des lymphocytes T auxiliaires (TH2 et certains TH1) spécifiques du même antigène reconnaissent les complexes peptides : CMH II présentés par le lymphocyte B (*fig. 4*). Ce mode de présentation de l'antigène fait également intervenir d'autres cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques, qui auront préalablement déjà activé et induit la différenciation de ces mêmes lymphocytes T naïfs en cellules auxiliaires. La fonction de présentation du lymphocyte B permet une activation réciproque T-B, elle met en jeu des molécules membranaires (CD40/CD40Ligand) et la sécrétion de cytokines (IL-4, IL-5, IL-6) qui induisent la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes ou B-mémoires (*fig. 4*).

La liaison du CD40 (lymphocytes B) avec son ligand CD40L (lymphocytes T) contribue à l'entrée en cycle de la cellule B et est essentielle pour les réponses B aux antigènes thymo-dépendants ; des patients ayant des mutations affectant le gène du CD40L ont une réponse anticorps inefficace et souffrent d'un déficit immunitaire de l'immunité humorale (syndrome d'hyper-IgM lié à l'X).

La rencontre du lymphocyte B avec un antigène et des cellules T spécifiques du même antigène aboutit à son activation et à une active prolifération qui se déroule d'abord dans la zone T des tissus lymphoïdes. Certains lymphocytes B se différencient en plasmocytes sécrétant des IgM ou des IgG, procurant la première source d'anticorps ; d'autres migrent dans les follicules lymphoïdes où ils se multiplient très rapidement pour former un centre germinatif. Les centres germinatifs sont le siège d'une intense prolifération au cours de laquelle surviennent des mutations somatiques au niveau des gènes VH et VL. Ces mutations somatiques sont à la base de la maturation d'affinité des anticorps. Elles permettent la génération de nouveaux clones de cellules B ayant une affinité plus ou moins forte pour l'antigène. C'est au contact des cellules folliculaires dendritiques (FDC) que survient la sélection des cellules B nouvellement générées. Les FDC sont des cellules spécialisées dans le maintien de l'antigène à leur surface et jouent un rôle dans la sélection de lymphocytes B de haute affinité pour l'antigène et le maintien de cellules-mémoires (*fig. 5*).

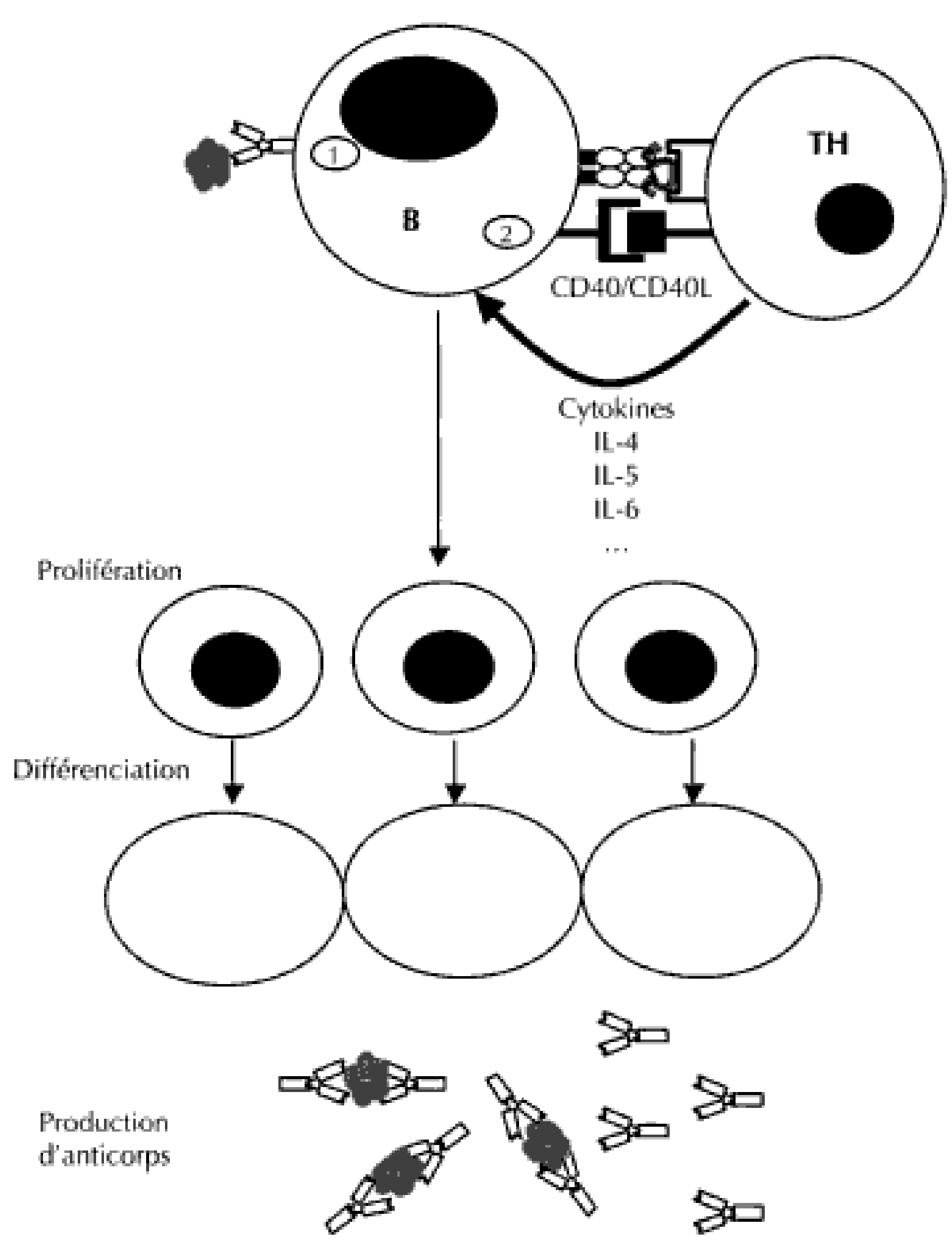


Figure 4. Coopération B-T pour la production d'anticorps

Les cellules B productrices d'anticorps de haute affinité pour l'antigène reçoivent un signal de survie de la FDC alors que celles produisant des anticorps de faible affinité meurent par apoptose (*fig.* 5). Après cette sélection, les cellules B quittent le centre germinatif et deviennent des cellules-mémoires ou des plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

Le mécanisme qui induit la différenciation des cellules B en plasmocytes ou en cellules-mémoires n'est pas complètement élucidé mais impliquerait des cellules T et les molécules CD40/CD40L. Après leur différenciation, les plasmocytes ont une durée de vie d'environ 4 semaines dans la moelle osseuse où la *lamina propria* des surfaces épithéliales. Les cellules-mémoires qui contribuent à maintenir une immunité protectrice ne sécrètent pas d'anticorps mais peuvent rapidement être activées en cas de confrontation ultérieure avec l'antigène.

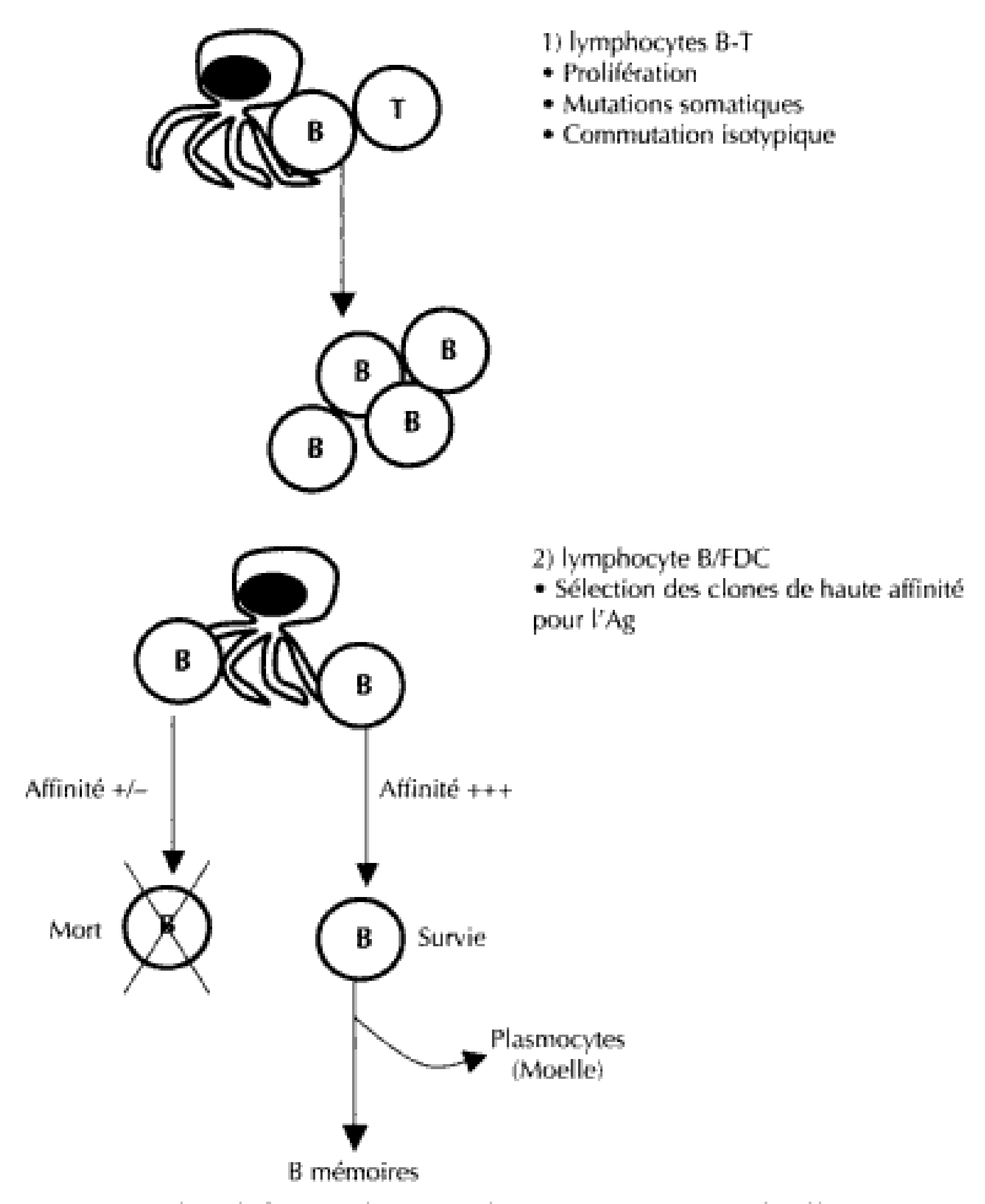


Figure 5. Coopération cellulaire dans le centre germinatif

G. Rôle du BCR à la surface des lymphocytes B

Le récepteur des cellules B a donc triple rôle :

- après fixation de l'antigène, il est responsable de la transduction de signaux intracellulaires participant à l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B ;
- il permet la captation, l'internalisation et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T favorisant les interactions entre ces deux cellules ;
- il permet également l'interaction entre les lymphocytes B et les FDC dans les follicules lymphoïdes.

H. Commutation isotypique (*switch*)

Un second phénomène très important survient dans les centres germinatifs, la commutation isotypique des Ig. La commutation isotypique va permettre aux lymphocytes B de produire d'abord des IgM puis des IgG, IgA ou IgE. Elle est déclenchée par l'interaction entre les molécules CD40 (lymphocytes B) et CD40L (lymphocytes T) et est également sous le contrôle des cytokines produites par le lymphocyte T comme l'IL-4, l'IL-5, l'IFN-γ et le TGF β (*tabl.* 2).

Tableau 2. Rôle des cytokines dans la régulation de la commutation isotypique chez la souris

	IgM	IgG3	IgG1	IgG2b	IgG2a	IgA	IgE
IL-4	Inhibition	Inhibition	Induction		Inhibition		Induction
IL-5							
IFN-γ	Inhibition	Induction	Inhibition		Induction		Inhibition
TGF-β	Inhibition	Inhibition		Induction		Induction	

I. Fonctions et distribution des isotypes

Chez l'homme, chaque isotype a une fonction spécialisée et une distribution particulière. Ainsi des anticorps ayant la même spécificité pour un antigène peuvent avoir des fonctions différentes adaptées à chaque compartiment de l'organisme. Les premiers anticorps produits sont des IgM qui, en formant des pentamères, peuvent fixer simultanément des antigènes multimériques ou facilement activer le complément. Du fait de leur grande taille, les IgM pentamériques sont confinées dans le sang. Les autres isotypes sont plus petits et diffusent plus facilement vers les tissus. Les IgG sont majoritaires dans le sang alors que l'on retrouve plutôt des IgA dans les sécrétions. Les IgG sont très efficaces pour l'opsonisation (phagocytose) et l'activation du complément alors que les IgA sont plutôt des anticorps neutralisants. Les IgE sont faiblement représentées dans le sang et les tissus, mais sont avidement captées à la surface des mastocytes (FcεR). La fixation de l'antigène au IgE déclenche la libération par le mastocyte de nombreux médiateurs chimiques (histamine) (*tab.* 3). Les IgA sont surtout actives au niveau des surfaces épithéliales. Les plasmocytes sécréteurs d'IgA sont retrouvés dans la *lamina propria* située sous la membrane

Tableau 3. Rôle des différents isotypes

	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Neutralisation	+	–	++	++	++	++	++	–
Opsonisation	–	–	+++	–	++	+	+	–
ADCC	–	–	++	–	++	–	–	–
Sensibilisation des mastocytes	–	–	–	–	–	–	–	++++
Activation du complément	++++	–	++	+	++	–	+	–

basale des épithéliums digestifs et respiratoires. Des dimères d'IgA liés à une chaîne J diffusent à travers la membrane basale et sont transportés par transcytose jusqu'à la surface de l'épithélium (*tabl. 4*).

Tableau 4. Distribution des différents isotypes

	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Transport vers les épithéliums	+	–	–	–	–	–	+++ dimères	–
Passage à travers le placenta	–	–	+++	+++	+++	+++	–	–
Diffusion dans les espaces extra-vasculaires	+/–	–	+++	+++	+++	+++	++ monomère	++
Taux sériques (mg/mL)	1.5	0.04	9	3	1	0.5	2.1	0.0003

Le nouveau-né est relativement immature sur le plan immunologique. Cet état se traduit par la difficulté d'induire une réponse anticorps spécifique de certains antigènes et par une réponse anticorps restreinte initialement à la production d'IgM. La production d'IgG ne débute qu'à l'âge de 2 mois chez le nourrisson humain.
En cas d'infection utérine ou néonatale, la réponse immunologique du nouveau-né sera constituée d'IgM (cette propriété est utilisée dans les sérodiagnostics de rubéole ou de toxoplasmose) ; les IgG et les IgA retrouvées sont d'origine maternelle soit par transfert transplacentaire, soit par allaitement. Compte tenu de la demi-vie des IgG transférées, une période critique est retrouvée vers l'âge de 3 mois sauf en cas d'allaitement prolongé.

II. Immunité à médiation cellulaire

L'immunité cellulaire nécessite la présence de lymphocytes T matures dans l'organisme. La différenciation des cellules T chez l'homme commence vers le 3e ou le 4e mois de la vie fœtale si le fœtus présente un développement thymique normal. Alors que l'ablation du thymus à l'âge adulte est sans conséquence sur les fonctions immunitaires, une anomalie de développement du thymus pendant la vie fœtale sera responsable d'un déficit de production de cellules T (syndrome de Di George et souris *nude*).

A. Caractères généraux de la réponse cellulaire

Les agents infectieux peuvent se répliquer dans différents compartiments cellulaires. Les virus et certaines bactéries se répliquent dans le cytosol alors que d'autres bactéries ou certains parasites se multiplient dans le système vésiculaire (endosome et lysosome) de la cellule. Pour lutter contre ces agents, le système immunitaire a élaboré plusieurs stratégies d'élimination. Les cellules infectées par des virus ou des bactéries qui se développent dans le cytosol seront détruites par les lymphocytes T cytotoxiques qui expriment la molécule CD8. Les pathogènes se multipliant dans le système vésiculaire des cellules seront détectés par les

lymphocytes T auxiliaires qui expriment le CD4. Les lymphocytes T CD4 dits *auxiliaires* sont spécialisés dans l'activation d'autres cellules du système immunitaire. Deux types de cellules T auxiliaires se distinguent en fonction des cellules avec lesquelles ils interagissent : les cellules TH1 (T inflammatoires), qui activent les macrophages afin de détruire les bactéries intravésiculaires qu'ils hébergent, et les cellules TH2 qui régulent la production d'anticorps par les lymphocytes B (*fig. 6*).

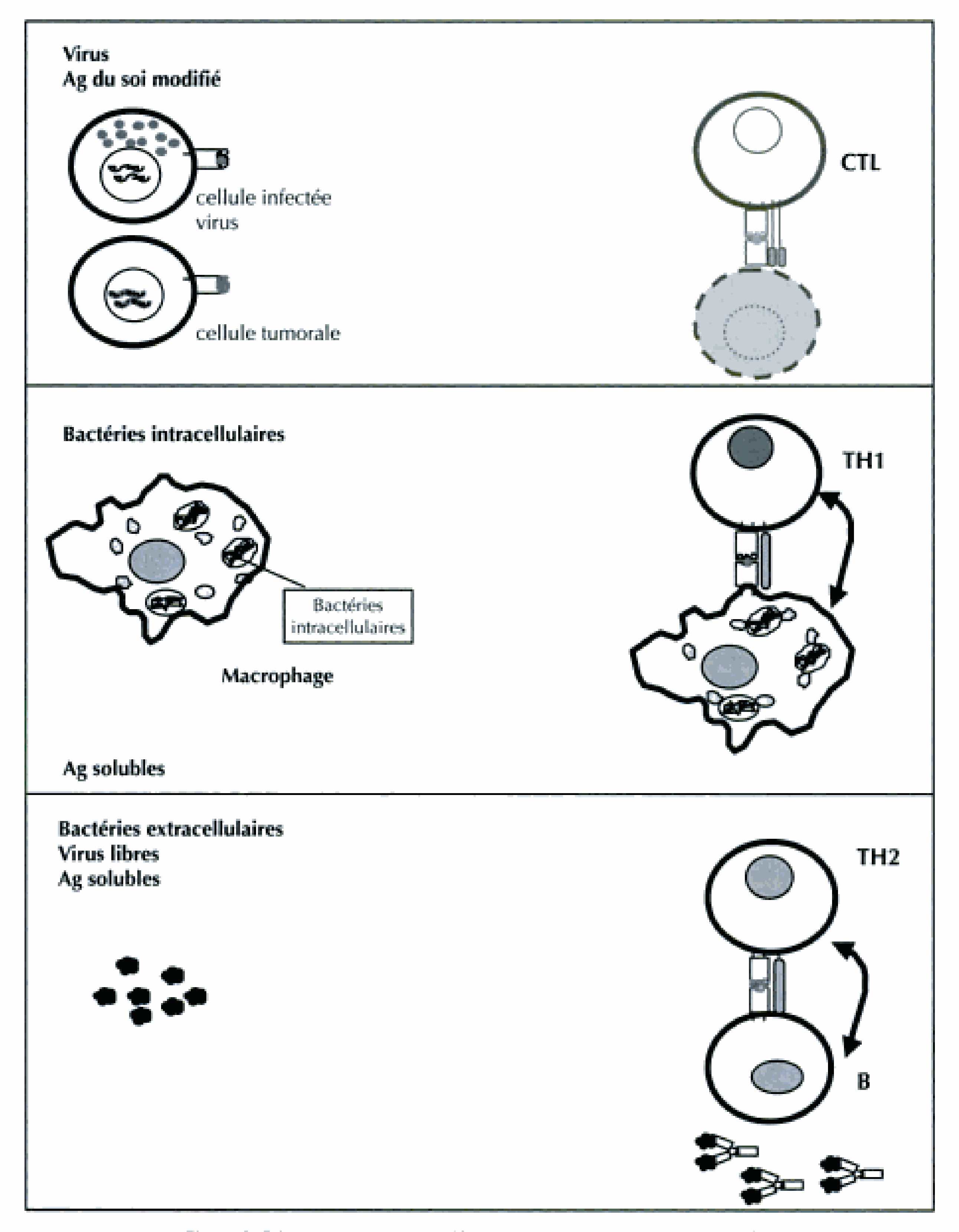


Figure 6. Rôles des cellules effectrices de l'immunité cellulaire

Pour obtenir une réponse immune adaptée, les lymphocytes T doivent pouvoir distinguer le matériel antigénique provenant du cytosol ou du système vésiculaire. Cette distinction est possible parce que les peptides venant de ces deux compartiments sont complexés et exprimés à la surface cellulaire par deux classes différentes des molécules du CMH. Les peptides provenant du cytosol sont associés aux molécules de classe I du CMH et seront reconnus par les lymphocytes T CD8. Les peptides venant du compartiment vésiculaire seront complexés aux molécules de classe II du CMH et reconnus par les lymphocytes T CD4. La dégradation d'antigènes complexes en peptides antigéniques est appelée apprêtement de l'antigène, et l'on parle de présentation de l'antigène pour l'expression de ces peptides associés aux molécules de CMH à la surface des cellules.

B. Récepteur des cellules T (TCR)

Le récepteur αβ des cellules T est constitué de deux chaînes polypeptidiques α et β liées entre elles par un pont dissulfure. Cet hétérodimère a une structure très proche du fragment Fab d'une Ig et assure la reconnaissance de l'antigène pour la plupart des lymphocytes T. Le TCR γδ représente une autre catégorie de récepteur exprimé par une minorité de lymphocytes T dont le rôle n'est pas complètement déterminé mais qui seraient impliqués dans la reconnaissance d'antigènes lipidiques et glycolipidiques.
Il existe aussi bien au niveau protéique que génique de nombreuses similitudes entre les chaînes du TCR et celles des Ig. Du côté amino-terminal, on retrouve une région variable V qui comprend, comme pour les Ig, des éléments V, D et J pour les chaînes β et δ, et des éléments V et J pour les chaînes α et γ. Du côté carboxy-terminal, on retrouve une région constante, une courte charnière avec un résidu cystéine impliqué dans le pont dissulfure entre les deux chaînes, et enfin un domaine transmembranaire hydrophobe qui interagit avec les chaînes γ, δ et ε de la molécule CD3. Chaque chaîne se termine par un court segment intracytoplasmique (*fig.* 7). Le complexe CD3 est formé de l'association de 5 chaînes protéiques (ζ η, δ, ε, γ) transmembranaires, liées de manière non covalente à la molécule du TCR. Les domaines intracytoplasmiques de ces chaînes contiennent des séquences appelées motifs d'activation du récepteur immunologique dépendant de la tyrosine (ITAMs) qui, après stimulation, les mettent en contact avec des tyrosines kinases du cytosol. Le complexe CD3 est indispensable à l'assemblage et l'expression du récepteur. Grâce aux domaines intracytoplasmiques de ses chaînes, il est responsable de la transduction du signal déclenché par la fixation de l'antigène au TCR (*fig.* 7).

C. Organisation des gènes du TCR

La structure et le mode d'assemblage des gènes codant pour les chaînes αβ et γδ du TCR rappellent à de nombreux égards l'organisation des gènes des immunoglobulines. Trois loci, TCRA/D (chromosome 14), TCR B (chromosome 7) et TCR G (chromosome 7) codent pour les chaînes α, δ, β et γ du TCR.
Les chaînes α et γ, comme les chaînes légères des Ig, sont le résultat de l'assemblage de segments V et J. Les gènes des chaînes β, comme ceux des chaînes lourdes

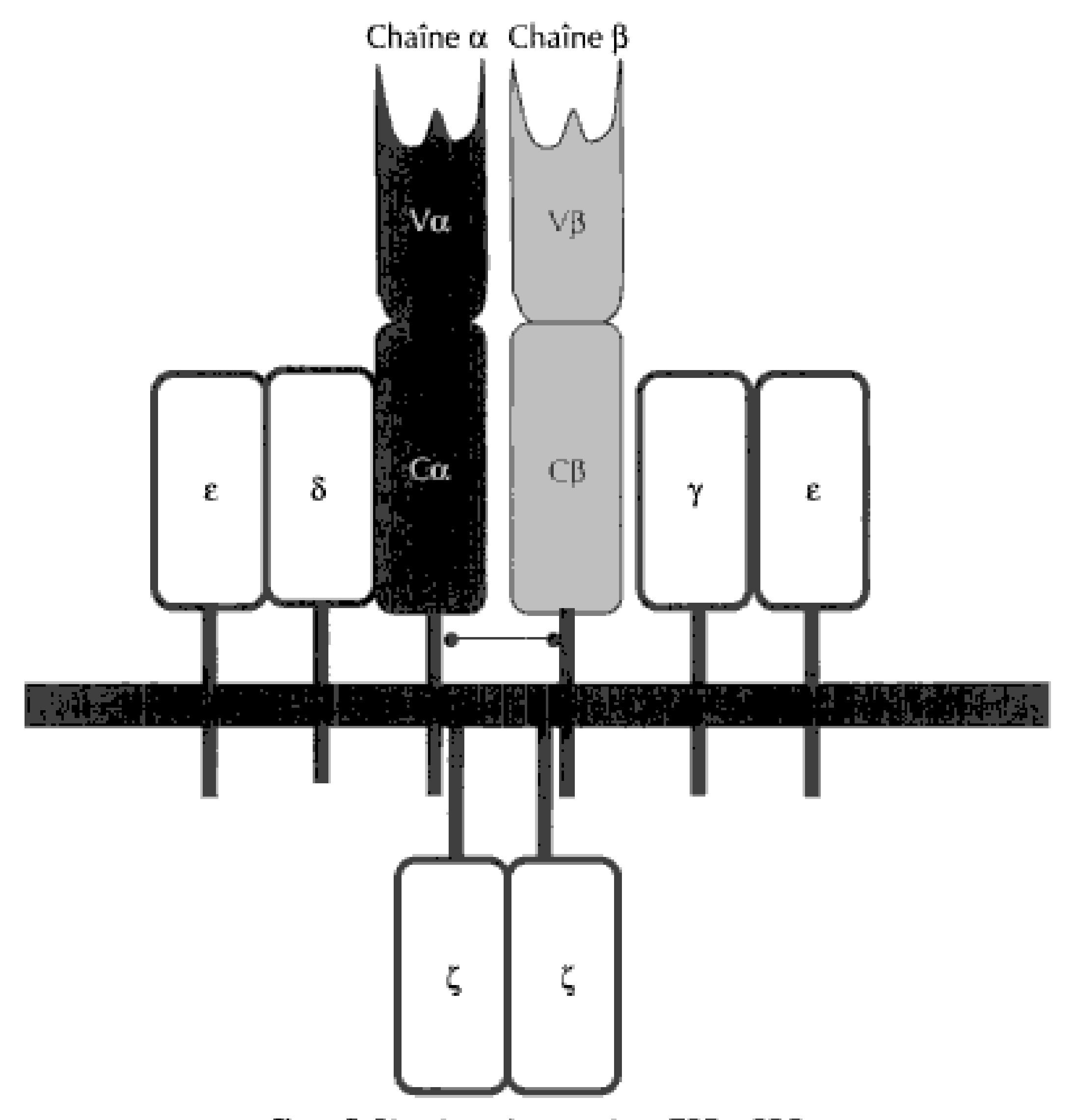


Figure 7. Structure du complexe TCR : CD3

des Ig, ont des segments D en plus des segments V et J. Les segments des gènes du TCR subissent un réarrangement dans le thymus pour former des exons complets de segments variables. Chaque segment V, D ou J est flanqué de séquences de recombinaison qui sont reconnues par le complexe enzymatique (recombinase) impliqué dans la recombinaison V-(D)-J. Les gènes des récepteurs des cellules T ont globalement le même nombre de segments V que les Ig mais seuls les gènes des Ig peuvent subir des mutations somatiques qui augmentent encore leur diversité.
Au total, aussi bien au cours du développement des lymphocytes T que des lymphocytes B, la recombinaison V-(D)-J est soumise à une régulation très stricte. Cette régulation confère aux recombinaisons V-(D)-J une quadruple spécificité :

- une spécificité cellulaire : la recombinaison a lieu dans les cellules lymphoïdes immatures ;
- une spécificité de lignée : dans les cellules normales, la recombinaison des Ig a lieu dans les lymphocytes B et celle des TCR dans les lymphocytes T ;
- une spécificité chronologique : la recombinaison des gènes des TCR et Ig est chronologiquement ordonnée ;
- une spécificité de segments : la recombinaison préférentielle de certains segments survient à certains stades de la maturation lymphocytaire.

D. Autres molécules coréceptrices du TCR

Les lymphocytes T se répartissent en deux classes principales qui se distinguent par la classe des molécules du CMH qu'ils reconnaissent, par des fonctions différentes et par la présence exclusive à leur surface des molécules CD4 ou CD8. La molécule CD4 se lie à la molécule du CMH de classe II, et la molécule CD8 à la molécule du CMH de classe I. Lors de la reconnaissance de l'antigène, les molécules CD4 ou CD8 s'associent à des composants du récepteur des cellules T et participent à la transduction du signal. C'est pourquoi elles sont appelées coréceptrices.

E. Ontogénie des cellules T

Les cellules T se développent à partir des cellules souches de la moelle qui migrent vers le thymus. L'activité du thymus est particulièrement importante avant la puberté et décroît à l'âge adulte. Dans le thymus, les cellules T immatures (thymocytes) prolifèrent et se différencient en passant par une série de stades phénotypiques identifiables. C'est au cours de ce développement que les thymocytes réalisent le réarrangement des gènes du TCR et subissent une double sélection (positive et négative) qui définit le répertoire des cellules T matures.
Le thymus comprend une région sous-capsulaire, un cortex contenant de nombreux lobules et une région interne, la *medulla*. Les cellules dérivées de la moelle osseuse sont distribuées de manière différente entre le cortex et la *medulla* ; le cortex contient surtout des thymocytes immatures alors que la *medulla* contient des cellules T plus matures. Cette répartition reflète les différents événements de la différenciation des cellules T dans ces compartiments dont le stroma représente un environnement particulièrement favorable à leur développement.
Lorsque les précurseurs des cellules T pénètrent dans le cortex thymique, ils n'expriment quasiment aucun marqueur des cellules T matures et leurs gènes des chaînes du TCR ne sont pas réarrangés. Ils entrent alors dans une phase de prolifération intense et expriment la molécule spécifique des cellules T : le CD2. À ce stade, les thymocytes immatures n'expriment pas encore le complexe CD3 : récepteur ni les molécules CD4 et CD8, ils sont appelés thymocytes *doubles négatifs*. Les thymocytes doubles négatifs (20 %) qui ont réarrangé et qui expriment les gènes codant pour le récepteur γ/δ constitueront la lignée des lymphocytes T γ/δ et suivront un développement séparé de la grande majorité des thymocytes. La plupart des thymocytes doubles négatifs sont CD44+CD25 et n'ont pas réarrangé leur gène α et β du TCR, la transition vers le stade CD44-CD25+ s'accompagne du réarrangement du gène de la chaîne β. La chaîne β fonctionnelle est alors appariée à un substitut de chaîne α (pTα) et est complexée au CD3. L'expression de ce complexe induit la perte de CD25, la prolifération et l'expression simultanée des molécules CD4 et CD8 ; ces cellules sont alors appelées thymocytes *doubles positives*. À ce stade survient le réarrangement de la chaîne α du TCR qui permettra l'expression d'un récepteur α/β complet (*fig. 8 et 9*).

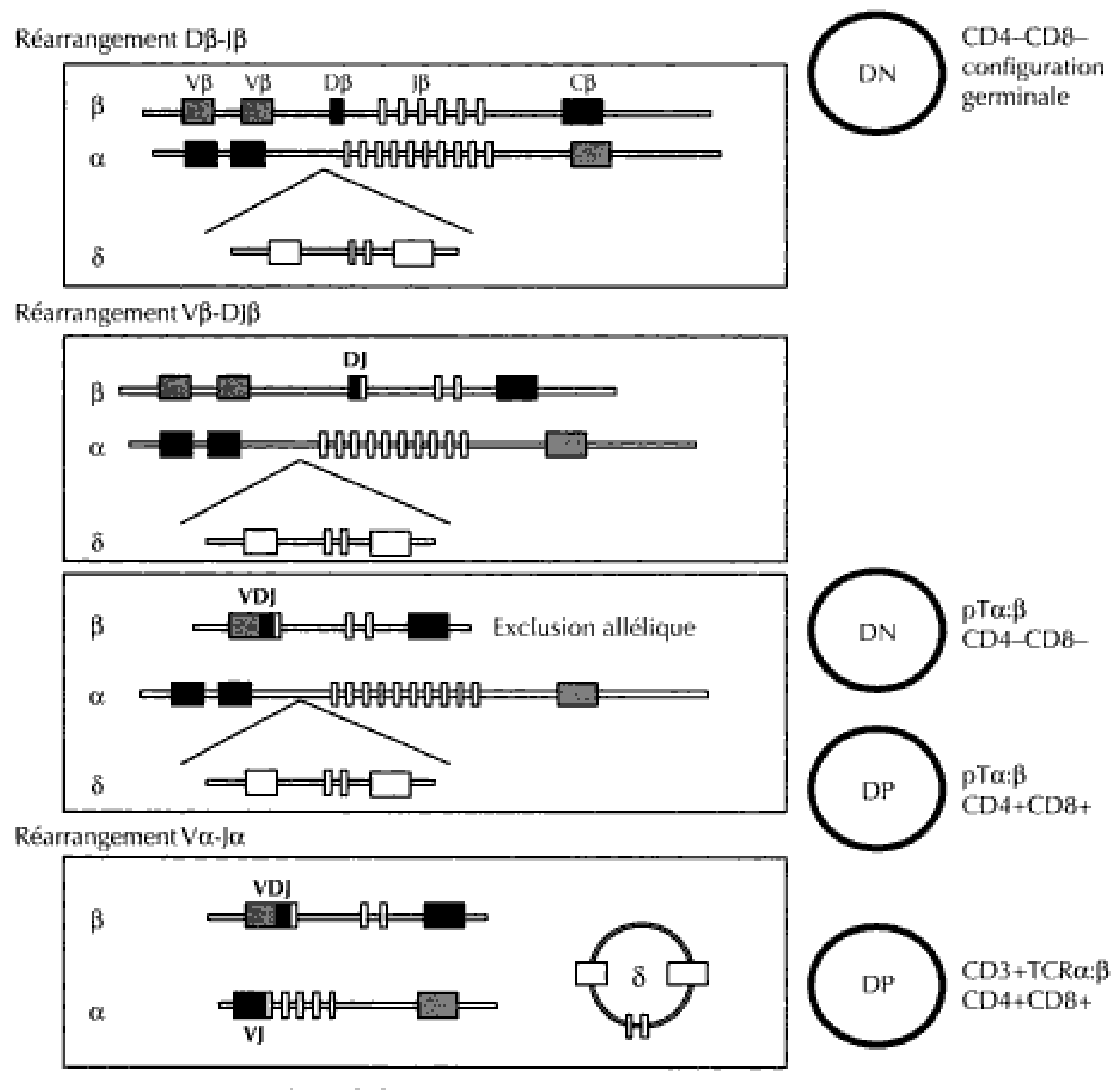


Figure 8. Ontogénie des cellules T dans le thymus

Sélection thymique

Au cours de leur passage à travers le thymus, les thymocytes vont subir une double sélection qui aboutit à la constitution du répertoire des lymphocytes T. Les thymocytes, dont le TCR reconnaît les molécules du CMH autologue, subissent une sélection positive et continuent leur différenciation. Au cours de la sélection positive, plus de 95 % des cellules T ne seront pas sélectionnées et mourront par apoptose. Les cellules ayant passé la première sélection subissent une deuxième sélection (négative) qui consiste à induire l'apoptose des cellules autoréactives qui expriment un TCR ayant une forte affinité pour les molécules du CMH autologue présentes à la surface des cellules dendritiques et macrophages de la *medulla*. Après cette double sélection, les cellules survivantes sont simples positives CD4 ou CD8, et quittent le thymus pour rejoindre le groupe de cellules T périphériques (*fig.* 9).

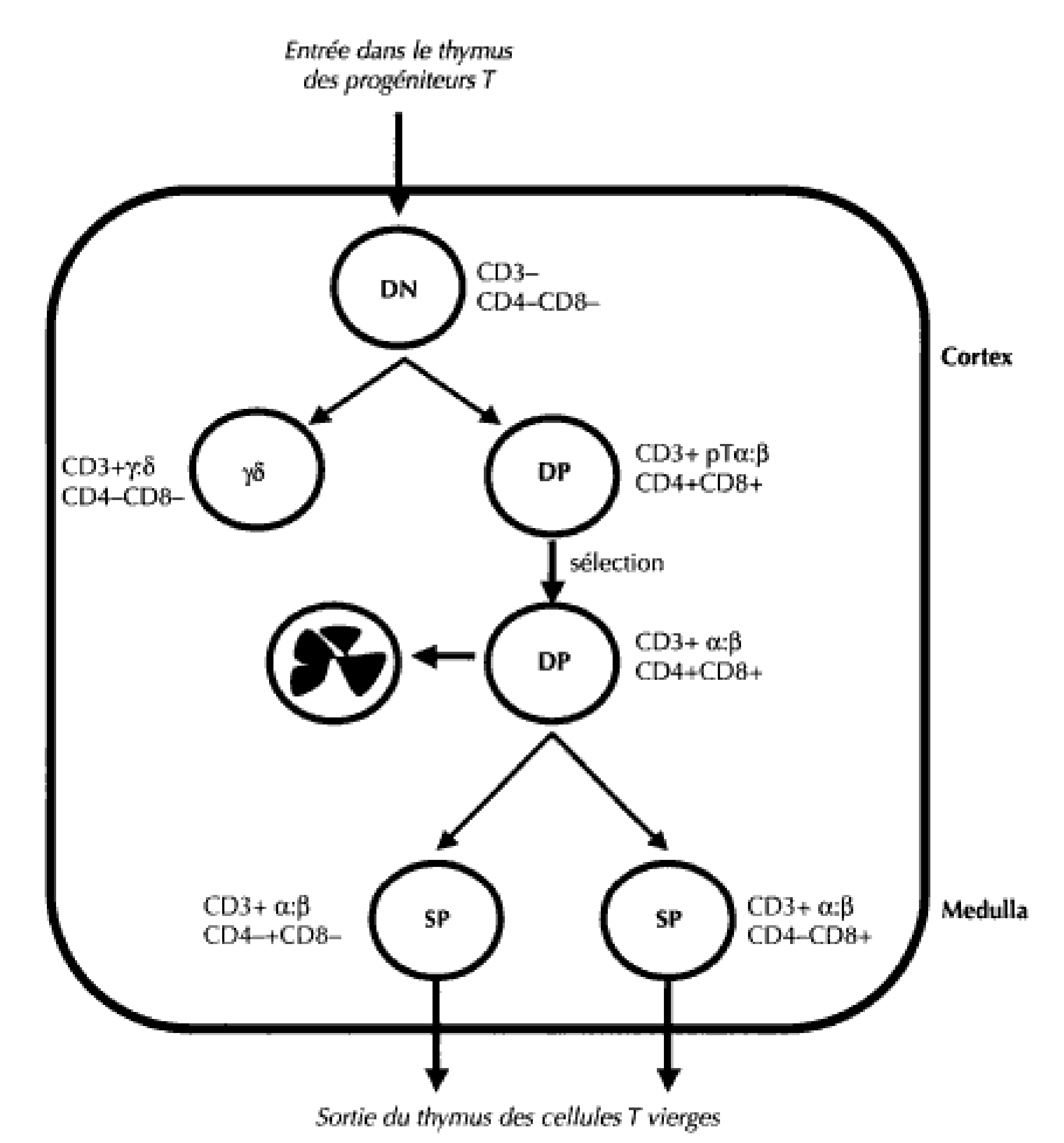


Figure 9. Schéma de la différenciation lymphoïde T dans le thymus

F. Différenciation des cellules T effectrices

Les lymphocytes T qui se sont différenciés dans le thymus entrent dans la circulation et migrent dans les organes lymphoïdes puis circulent à nouveau jusqu'à la rencontre avec l'antigène. Pour mettre en place une réponse immune adaptative, un lymphocyte T vierge (naïf) doit proliférer et se différencier en cellule T effectrice. Les différentes classes de lymphocytes T effecteurs sont les cellules T CD8 cytotoxiques et les lymphocytes T CD4 auxiliaires (TH1 ou TH2).

1. Cellules présentatrices d'antigènes

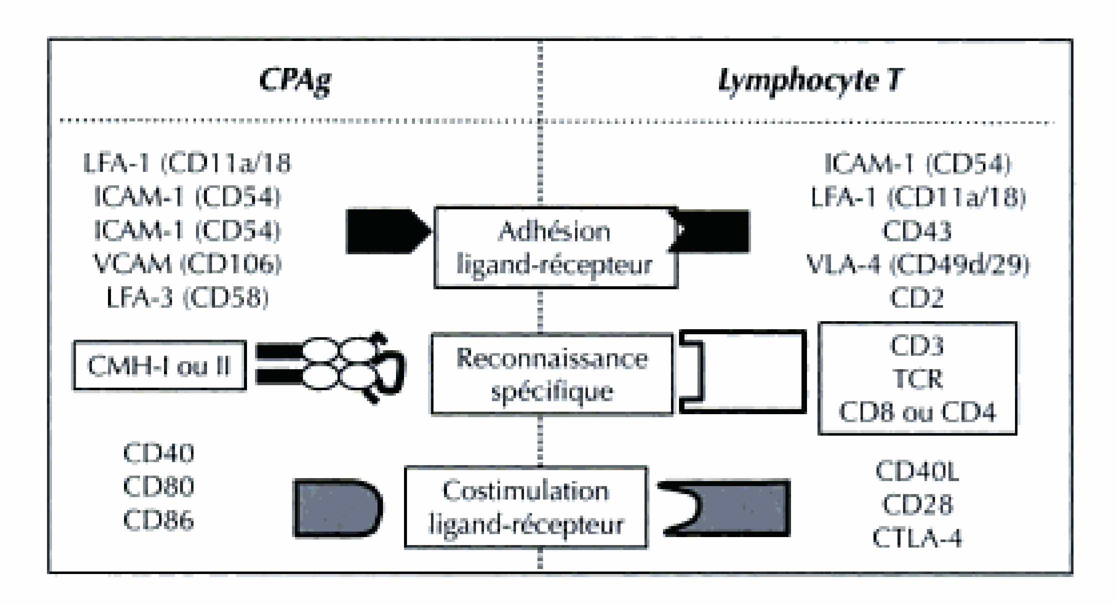
Les pathogènes infectant les tissus périphériques sont piégés dans les organes lymphoïdes drainant ces tissus ; ceux qui entrent dans le sang sont retenus par la rate ; et ceux qui infectent les muqueuses s'accumulent dans les plaques de Peyer ou les

amygdales. Les réponses immunes adaptatives sont donc engagées dans les organes lymphoïdes et non pas dans le site de pénétration des pathogènes. Pour être activé, proliférer et se différencier, un lymphocyte T vierge doit reconnaître l'antigène spécifique à la surface de cellules présentatrices d'antigène (CPAg) professionnelles. Ces cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène existent dans les organes lymphoïdes périphériques où elles présentent des fragments peptidiques complexés aux molécules du CMH aux lymphocytes T. Les CPAg les plus importantes sont les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B. Des lymphocytes T naïfs circulent constamment à travers les organes lymphoïdes périphériques et entrent en contact avec des CPAg à chaque passage. Ainsi, la probabilité de reconnaître l'antigène vis-à-vis duquel ils sont spécifiques est élevée. Les cellules dendritiques sont particulièrement efficaces pour présenter l'antigène aux lymphocytes naïfs (*priming*). Contrairement aux autres CPAg, elles ont la capacité de capter les antigènes dans les tissus puis de migrer dans les organes lymphoïdes pour assurer leur fonction de présentation. Leurs puissantes propriétés de présentation et stimulation des lymphocytes T naïfs a pour conséquence la mise en place d'une réponse immune primaire et d'une mémoire immunologique.

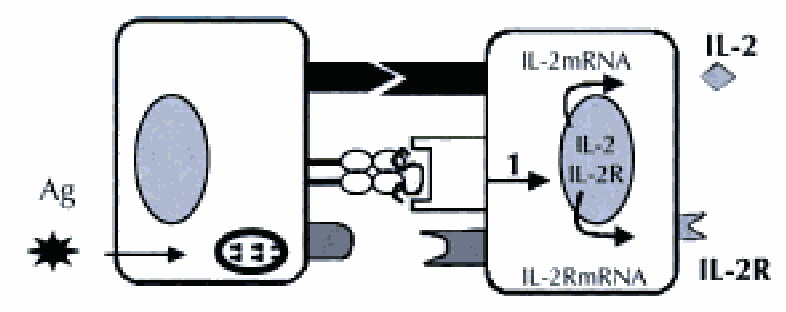
2. Activation des lymphocytes T naïfs

Lorsqu'elle passe dans la région corticale des ganglions, la cellule T se lie de manière transitoire aux CPAg qu'elle rencontre. Cette liaison cellulaire fait intervenir des molécules d'adhésion (LFA-1 et CD2 sur le lymphocyte T et ICAM-1, 2, 3 et LFA-3 sur la CPAg) et permet au lymphocyte T d'analyser le complexe peptide : CMH qui lui est présenté. Si le lymphocyte T reconnaît l'antigène, un signal est émis qui induit des modifications fonctionnelles des molécules d'adhésion et stabilise la liaison entre les deux cellules. La liaison du complexe peptide : CMH au récepteur T et au corécepteur CD4 ou CD8 transmet à la cellule T un premier signal (signal 1) indiquant que l'antigène a été reconnu. L'activation et l'expansion clonale des cellules T ne sont cependant possibles que si un signal costimulateur (signal 2) est délivré par la CPAg. Ce second signal est donné par la liaison du CD28 sur le lymphocyte T avec les molécules CD80 et CD86 sur la CPAg (*fig. 10*). En l'absence de signal 2, l'activation des lymphocytes T est impossible et débouche sur un état d'anergie.
Après avoir été activé, le lymphocyte T exprimera la molécule CTLA-4, qui se lie également aux molécules de costimulation (CD80/CD86) et a pour rôle de réguler l'activation des lymphocytes T. L'activation des cellules T induit l'expression du CD40L qui se lie au CD40 présent à la surface de la CPAg. L'interaction CD40L/CD40 augmente l'expression des molécules CD80 et CD86 à la surface de la CPAg permettant la survenue du second signal. Cette interaction induit également l'activation de la CPAg avec des conséquences différentes selon le type de CPAg (*fig. 11*). Le lymhocyte T qui a reçu les deux signaux entre en cycle et se multiplie (expansion clonale), ses cellules-filles se différencient en cellules T effectrices.
La prolifération et la différenciation des cellules T sont sous la dépendance de l'interleukine-2 (IL-2) produite par les cellules T activées elles mêmes, le rôle du second signal étant de stabiliser les ARNm de l'IL-2 et de son récepteur. La production d'IL-2 et l'expression de son récepteur à la surface induisent la prolifération

(expansion clonale) de la cellule T activée et sa différenciation (*fig. 10*). Les cellules T CD8 sont déterminées à devenir des cellules cytotoxiques. Les cellules T CD4 se différencient en cellules auxiliaires de type 1 (TH1) ou de type 2 (TH2). Le rôle des cellules TH1 auxiliaires est l'activation des macrophages, celui des cellules TH2 est de réguler la réponse humorale. La nature de l'antigène et l'environnement cytokinique (IL-12 et IL-4) qu'il induit orientent cette dernière différenciation en cellules TH1 ou TH2.



1 – Adhésion et reconnaissance de l'Ag (signal 1)



2 – Costimulation (signal 2)

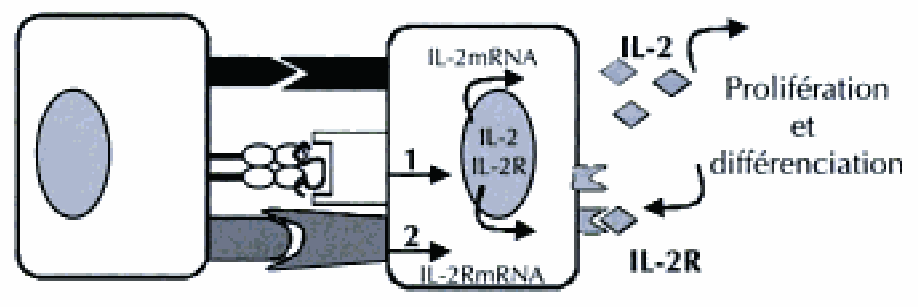


Figure 10. Activation des lymphocytes T naïfs, rôle des molécules de costimulation

3. Différenciation des cellules CD8 naïves en cellules T cytotoxiques (CTL)

Pour se différencier en CTL, les lymphocytes T CD8 naïfs ont été, dans un premier temps, activés par un CPAg de type cellule dendritique qui fournit le signal costi-

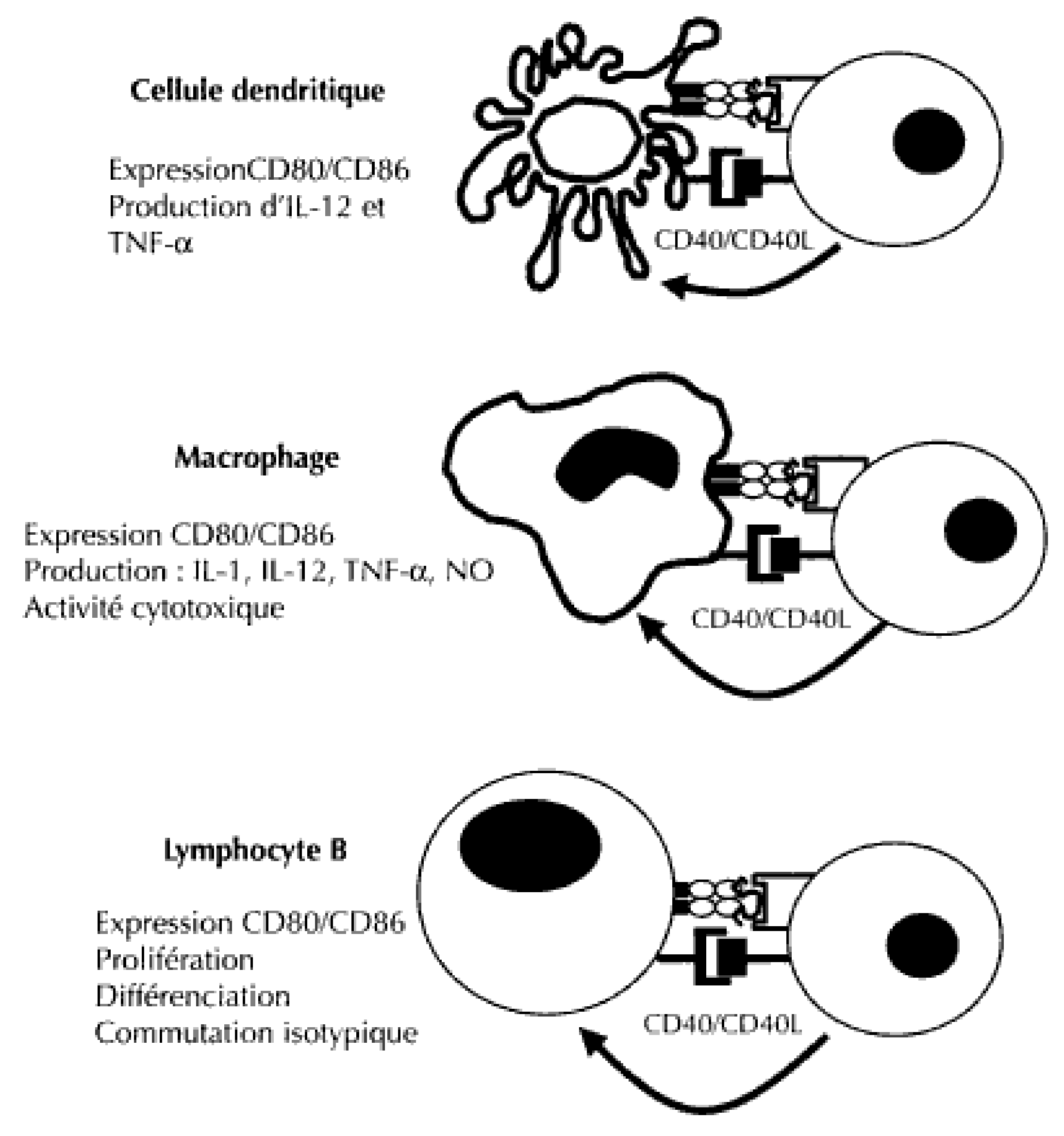


Figure 11. Effets de la ligation de CD40 sur les CPAg

mulateur nécessaire à la prolifération et à la différenciation. Dans de nombreux cas, une coopération avec des cellules T CD4 (production d'IL-2) est également nécessaire. Le rôle des CTL est de détruire les cellules infectées par des pathogènes cytosoliques (virus et certaines bactéries) et les cellules du soi modifié comme les cellules tumorales. La reconnaissance spécifique des complexes peptides : CMH I sur une cellule-cible par une cellule T CD8 cytotoxique conduit à la mort de la cellule-cible (*fig. 12*). Les CTL induisent la destruction de leurs cellules-cibles en produisant des protéines cytotoxiques (perforines, granzymes) et en exprimant à leur surface des molécules (Fas) qui induisent l'apoptose des cellules-cibles. Les CTL libèrent également de l'IFN-γ, du TNF-α et du TNF-β (lymphotoxine). L'IFN-γ inhibe la réplication virale et augmente l'expression des molécules du CMH I, accentuant ainsi la chance que les cellules infectées soient reconnues comme cibles. Il favorise également le recrutement et l'activation des macrophages. Le TNF-α agit en synergie avec l'IFN-α pour favoriser la destruction des cellules-cibles et le recrutement de macrophages.

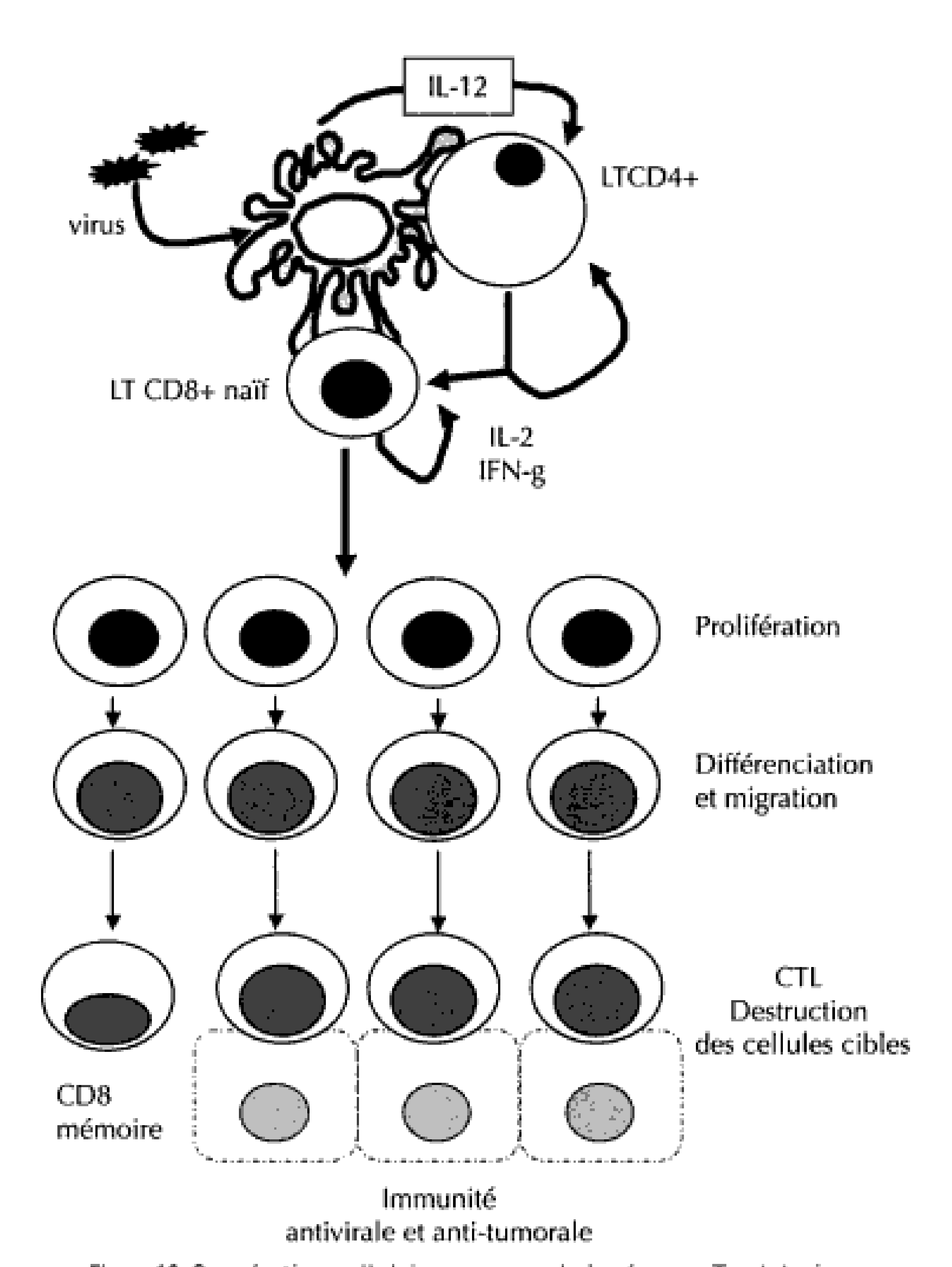


Figure 12. Coopération cellulaire au cours de la réponse T cytotoxique

4. Différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs et production de cytokines

Les lymphocytes T CD4 qui reconnaissent des peptides antigéniques fixés aux molécules de classe II du CMH peuvent se différencier en deux types de cellules T effectrices : des cellules T CD4 auxiliaires de type 1 (TH1/inflammatoire) et des cellules T CD4 auxiliaires de type 2 (TH2). Les cellules TH1 sont spécialisées pour activer des macrophages qui contiennent ou ont ingéré des pathogènes ; elles produisent principalement de l'IFN γ et de l'IL-2. Les cellules TH2 sont spécialisées dans l'activation et la différenciation des cellules B ; elles produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6 et de l'IL-10.

5. Activation des macrophages par les cellules TH1

Certains pathogènes comme les mycobactéries (tuberculose, lèpre) se développent dans les phagolysosomes des macrophages à l'abri des anticorps ou des CTL. L'élimination de ces pathogènes repose sur l'activation des macrophages par les lymphocytes T CD4 inflammatoires. Les macrophages peuvent également phagocyter des pathogènes extracellulaires et les détruire après avoir été activés par des lymphocytes T CD4 auxquels ils ont présenté l'antigène. Les macrophages activés subissent des modifications qui augmentent leur activité antibactérienne. L'activation des macrophages favorise la fusion des phagosomes aux lysosomes permettant la destruction des bactéries intracellulaires. Il existe également une augmentation de synthèse de peptides antibactériens, de radicaux libres et de monoxyde d'azote. Les macrophages activés sécrètent d'autre part de l'IL-12 qui favorise la différenciation des cellules T naïves en cellules TH1, et de l'IL-10 qui inhibe la production d'IFN-γ et limite les effets néfastes de l'activation macrophagique *(fig. 13)*.

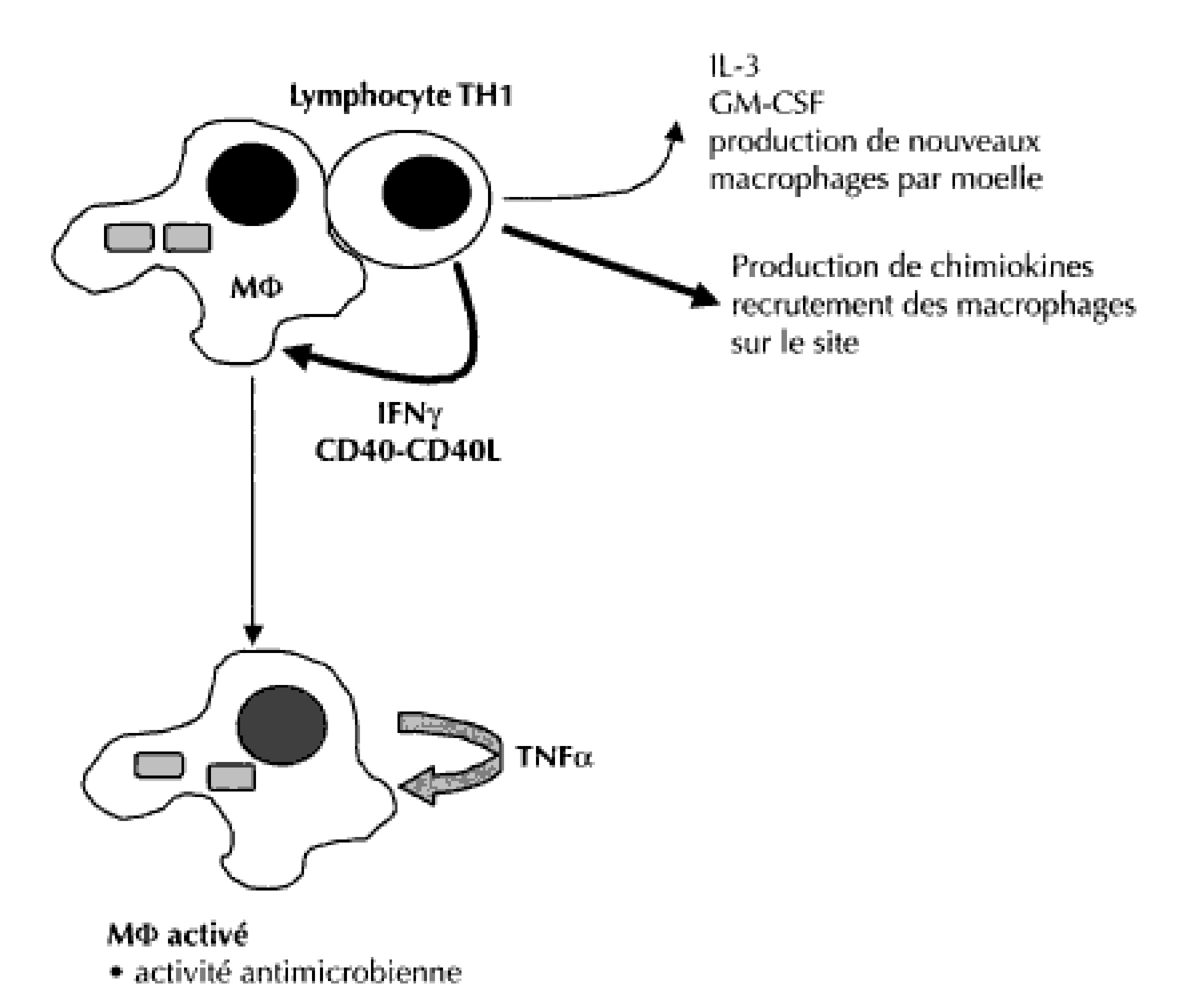


Figure 13. Coopération cellulaire au cours de l'activation des macrophages

6. Régulation de la réponse humorale par les cellules T auxiliaires TH2

L'activation des lymphocytes B et leur différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps nécessitent la collaboration de cellules TH2 (*fig. 4 à 6 et figure 11*). Ces cellules contrôlent le *switch* isotypique et jouent un rôle dans la survenue de mutation somatique. Cette interaction T-B fait intervenir des molécules membranaires (CD40L/CD40) et cytokines produites par le lymphocyte T (IL-4, IL-5, IL-6).

L'essentiel de la question

Le réarrangement somatique des gènes codant pour le récepteur à l'antigène des lymphocytes permet de générer un répertoire très varié de ces récepteurs (Immunoglobulines pour les lymphocytes B et TCR pour les lymphocytes T) et survient au cours des étapes précoces du développement des lymphocytes B et T.
Au cours de ce développement qui a lieu dans la moelle osseuse pour les B et dans le thymus pour les T, les lymphocytes subissent des étapes de différenciation et de sélection dont le but est d'obtenir au final des cellules matures et fonctionnelles.
Les lymphocytes B reconnaissent l'antigène grâce à leur immunoglobuline de surface et après activation sécrètent cette même immunoglobuline sous forme d'anticorps solubles qui constituent un moyen de défense contre les pathogènes situés dans l'espace extracellulaire.
Les lymphocytes T reconnaissent des peptides dérivés de l'antigène et associés aux molécules du CMH. Les deux classes de molécule du CMH s'associent à des peptides antigéniques qui proviennent de différents compartiments cellulaires et seront reconnus par différentes populations de lymphocytes T. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques reconnaissent des peptides d'origine endogène associés au CMH de classe I et tuent des cellules infectées. Les lymphocytes T CD4+ auxiliaires reconnaissent des peptides d'origine exogène associés au CMH de classe II et activent selon le cas, les macrophages pour éliminer les pathogènes intracellulaires et/ou les lymphocytes B pour sécréter des anticorps. Les lymphocytes T auxiliaires ont donc un rôle très important pour réguler à la fois les réponses humorales et cellulaires de l'immunité adaptative.
La réponse immune adaptative est basée sur la sélection clonale d'un répertoire de lymphocytes ayant des récepteurs pour l'antigène très divers et permet au système immunitaire de reconnaître presque n'importe quel antigène étranger. Après reconnaissance, les lymphocytes spécifiques d'un antigène prolifère et se différencient en cellules effectrices dont le but est l'élimination des pathogènes. Cette réponse immune adaptative aboutit également à la génération de lymphocytes mémoires qui permettront une réponse plus rapide et efficace en cas de réinfection.

Pour en savoir plus

- Janeway C.-A., Travers P. *Immunobiologie*, éd. de boeck université, Bruxelles, 2003.
- Revillard J.-P. *Immunologie, Immunobiologie*, éd. de boeck université, Bruxelles, 2001.

Les cellules de l'immunité

S. HUGUET, E. BALLOT, C. JOHANET
Laboratoire d'immunologie et d'hématologie biologiques, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris.

VII. Polynucléaires neutrophiles
VIII. Polynucléaires éosinophiles
IX. Polynucléaires basophiles
X. Plaquettes
XI. Globules rouges

Traiter des cellules de l'immunité revient à envisager une grande partie de l'immunologie. Dans ce chapitre seront passées en revue les différentes cellules impliquées dans les réactions immunitaires d'un point de vue descriptif, avec leurs origines, leur différenciation, leurs marqueurs et leurs récepteurs. En revanche, la dynamique des cellules entre elles n'est envisagée que pour situer le rôle de ces cellules, les réactions immunitaires et humorales sont détaillées dans l'article « Réponses immunitaires humorale et cellulaire et leur régulation ». La structure et la génétique des récepteurs T et B spécifiques à l'antigène sont traitées respectivement dans cet article et dans celui concernant les anticorps. Ces deux questions et le présent article sont indissociables. Enfin, les polynucléaires et les plaquettes ne sont abordées que du point de vue de leurs fonctions dans la réaction immunitaire.

I. Notions générales

L'immunologie peut se définir comme l'ensemble des mécanismes coordonnés cellulaires et humoraux interagissant entre eux afin d'éliminer des substances étrangères et d'assurer l'intégrité tissulaire. Cela suppose :
- reconnaissance et tolérance de ses propres molécules, reconnaissance et tolérance du soi afin que le sujet ne « s'autodétruise pas » ;
- reconnaissance et élimination du non-soi bactérien afin de lutter contre les agents pathogènes ;
- reconnaissance et élimination du soi altéré. Dans certains dysfonctionnements cellulaires consécutifs à un stress, par exemple une infection intracellulaire, l'expression de certaines molécules membranaires peut être modifiée ;
- reconnaissance de l'absence de soi sur des cellules et élimination de ces dernières. C'est le cas de cellules néoplasiques, ou infectées par des virus, avec abolition de l'expression de certaines molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

Cette fonction de surveillance s'appuie sur 2 piliers chez les vertébrés supérieurs :
- l'immunité spécifique ou adaptative, d'apparition lente lors d'une première réponse à un agent perturbateur, mais très rapide et de grande amplitude lors de contact ultérieur avec ce même agent perturbateur ;
- l'immunité naturelle ou innée, immédiatement efficace, dont les agents préexistent avant l'introduction de l'agent perturbateur, mais sans mémoire des expériences antérieures.

Toutes les cellules du système hématopoïétique interviennent à des degrés variés dans la réaction immunitaire. Elles dérivent toutes d'un précurseur totipotent, capable d'autorenouvellement et de donner naissance à des progéniteurs engagés dans les voies de différenciation lymphoïde ou myéloïde.

Mais seuls les lymphocytes T et B participent à l'immunité adaptative car capables de reconnaître une structure moléculaire spécifique grâce à de nombreuses copies sur leur membrane d'un même récepteur unique dans sa structure.

Les cellules phagocytaires, monocytes-macrophages, polynucléaires (PN), les plaquettes ainsi que les lymphocytes *natural killer* (NK) assurent l'immunité non spécifique, en même temps qu'ils participent à l'induction de la réponse adaptative.

À l'interface entre immunité innée et adaptative se trouvent des cellules présentatrices d'antigène (CPAg) qui expriment de façon constitutive les molécules du CMH de classe II. Elles phagocytent, par l'intermédiaire de nombreux récepteurs, les protéines exogènes, les découpent en peptides qu'elles associent aux molécules HLA. L'ensemble HLA-peptide est reconnu par le récepteur spécifique de l'antigène (Ag) du lymphocyte T.
Enfin, des cellules non hématopoïétiques, comme les cellules endothéliales ou les cellules dendritiques folliculaires, sont également impliquées dans l'induction et le contrôle de la réponse (*tableau 1*).

Tableau 1. Vue d'ensemble des différentes cellules de l'immunité

	Immunité non spécifique Action immédiate	Immunité spécifique Action retardée, mémoire
Acteurs principaux	Lymphocytes NK Monocytes-Macrophages	Lymphocytes T Lymphocytes B
	Lymphocytes NKT Cellules présentatrices d'antigène – Macrophages Lymphocytes B – Cellules dendritiques	
Acteurs secondaires *rôle très important dans les hypersensibilités de type 1 **rôle important dans les défenses antiparasitaires de type helminthe.	PNN PNE*, ** PNB/Mastocytes* Plaquettes** Cellules endothéliales	

De nombreuses cellules comme les lymphocytes T et B sont morphologiquement similaires, mais fonctionnellement différentes. On peut les distinguer par des protéines de surface caractéristiques d'un type cellulaire ou d'un stade de différenciation, reconnues par des anticorps (Ac) monoclonaux, définissant des classes de différenciation (molécules CD).

II. Lymphocytes B

A. Récepteur B ou BcR

Le lymphocyte B est la seule cellule dont la différenciation après activation aboutit à un plasmocyte sécréteur d'Ac. C'est la cellule clé de l'immunité humorale. Elle possède un récepteur spécifique ou BcR capable de reconnaître une portion d'Ag appelée déterminant épitopique (*fig. 1*). Ce BcR est un Ac à la surface de la cellule. Il est doté d'une portion transmembranaire et d'une courte portion cytosolique couplée à des molécules appelées Igα (CD79a) et Igβ (CD79b) qui transduisent le signal d'interaction de l'Ac avec le déterminant épitopique de l'Ag. Après pontage des BcR par l'Ag, il y a migration des BcR vers des parties de membrane riches en cholestérol et en glycolipides, appelées « raft lipidique » et contenant de nombreu-

ses enzymes membranaires impliquées dans la signalisation. Les deux molécules CD79 possèdent dans leurs parties intracytosoliques des tyrosines phosphorylables (séquence ITAM ou motif d'activation à base de tyrosine des immunorécepteurs) qui sont le point de départ de cascades enzymatiques aboutissant à l'activation lymphocytaire. Activé, le lymphocyte se différencie alors en plasmocyte synthétisant un Ac avec la même partie variable que l'Ac membranaire et reconnaissant la même structure antigénique.

Un lymphocyte B est en effet spécifique d'un Ag à travers la recombinaison des gènes encodant sa partie variable. Un lymphocyte B exprime un type unique de BcR, sous forme de nombreuses copies identiques (10^5 par cellule).

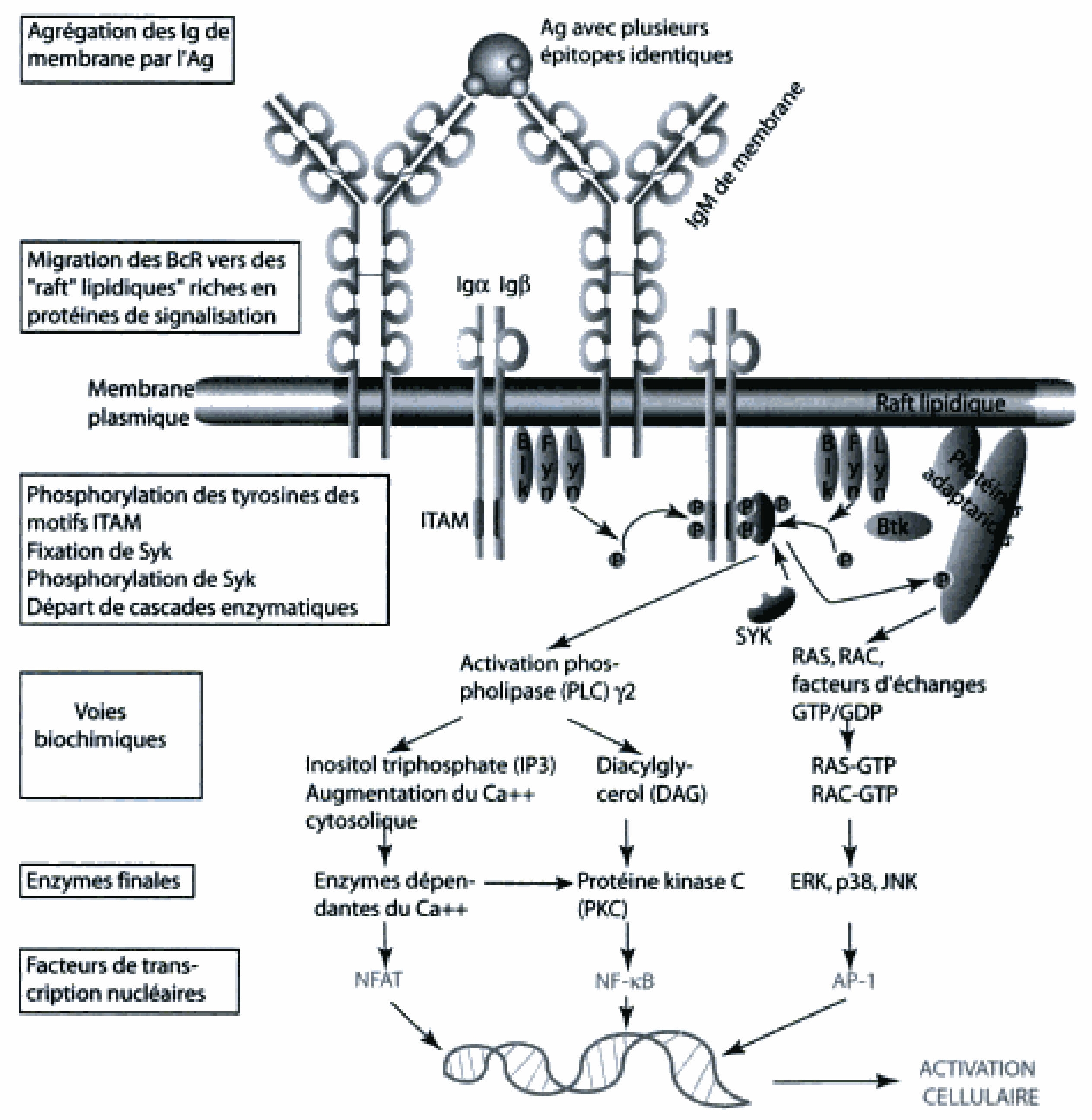


Figure 1. Structure du récepteur B à l'Ag (BcR). Le signal d'occupation des Ig de surface est transduit par les protéines Igα et Igβ. Les tyrosines de motifs activateurs à base de tyrosines (ITAM) sont phosphorylées par les kinases associées au BcR. Ces tyrosines deviennent des points d'ancrage pour des protéines adaptatrices qui sont aussi phosphorylées et qui délivrent un message d'activation cellulaire. Les principales protéines adaptatrices et les voies de transduction du signal sont indiquées à titre indicatif et dépassent le cadre de ce qu'il faut retenir

B. Marqueurs de surface importants des lymphocytes B

- BcR, c'est le récepteur à l'Ag, c'est une immunoglobuline (Ig) de surface ;
- CD79a, CD79b (Igα, Igβ). Ce dimère assure la transduction du signal après liaison de l'Ac de membrane à son déterminant épitopique sur l'Ag ;
- HLA classe II, exprimé de façon constitutive par les lymphocytes B ;
- CD20, molécule de la famille des tétraspanines, impliquée dans l'activation ou la régulation des lymphocytes B ;
- CD22, molécule de la superfamille des Ig, avec un motif inhibiteur ITIM dans sa partie cytoplasmique, impliqué dans la régulation des lymphocytes B ;
- CD24, molécule de fonction mal définie, attachée à la membrane plasmique par une queue phosphatidylinositol ;
- CD19, CD21, et CD81 forment un complexe qui délivre des signaux d'activation. CD21 est le récepteur CR2 à la fraction C3 du complément (*fig.* 2). Lorsqu'un complexe immun est recouvert de fragments C3, CD21 le capte et se rapproche du BCR. CD21 est associée à CD19 à fonction tyrosine kinase dans sa partie intracytoplasmique, capable de phosphoryler également les tyrosines du complexe BcR. Les signaux délivrés par CD19, CD21, CD81 agissent alors en synergie avec ceux du BcR, aboutissant à une intense activation du lymphocyte B. CD19 appartient à la superfamille des Ig, CD81 à celle des tétraspanines ;

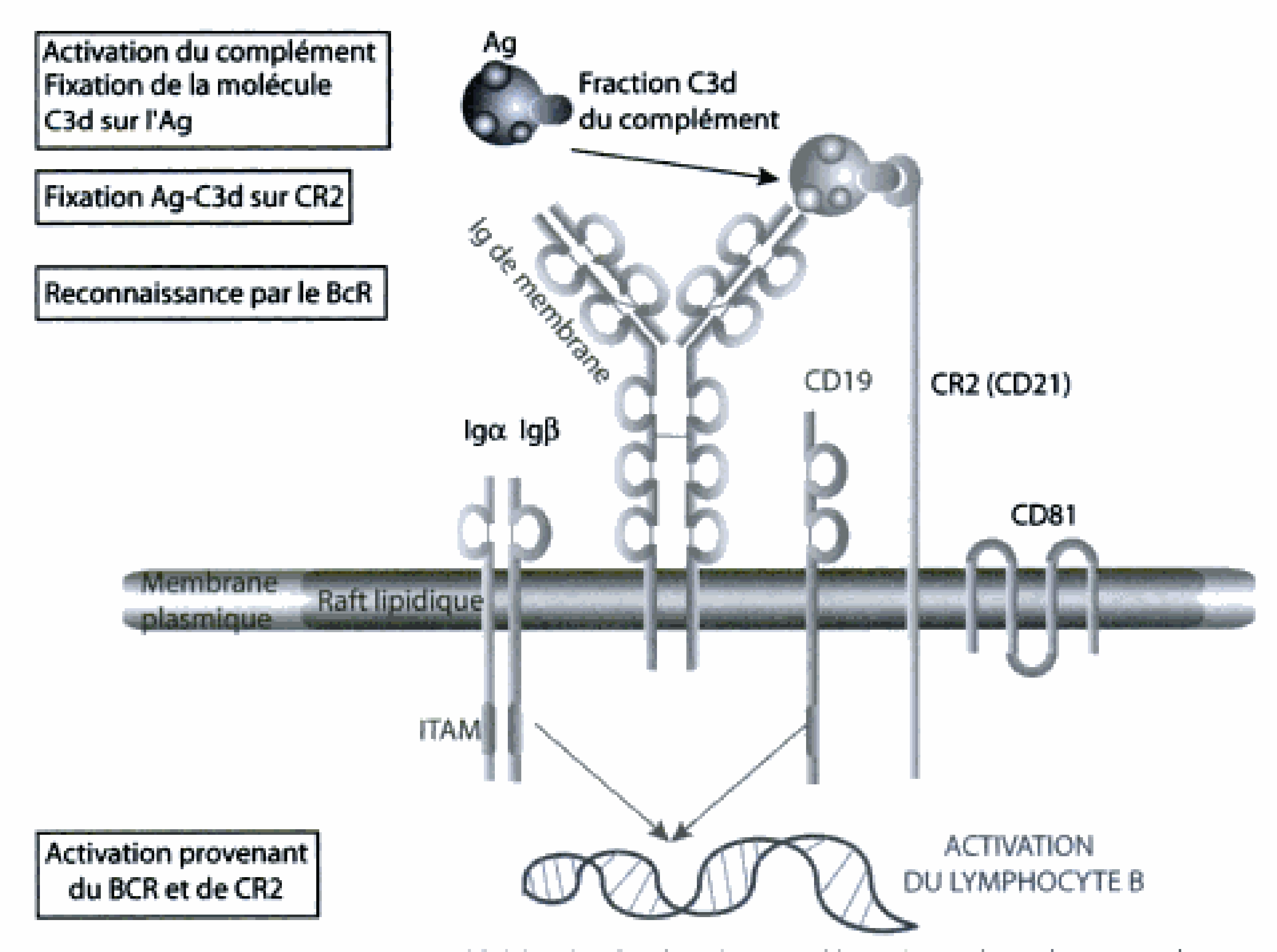


Figure 2. Complexe CD19, CD21, CD81. L'activation du complément par des micro-organismes conduit à la fixation d'un produit de dégradation du complément, le C3d sur l'Ag. Le lymphocyte B reconnaît simultanément l'Ag microbien par son BcR et se fixe à C3d par un récepteur au complément CR2 ou CD21. Le complexe associé CD19, CD81 délivre alors un signal d'activation qui s'ajoute au signal du BcR

- CD32 correspond à deux molécules reconnaissant le fragment Fc des IgG, RFc-γIIa et RFcγIIb. Leur structure les fait appartenir à la super famille des Ig. RFcγIIa est présente sur les lymphocytes B, mais aussi sur les monocytes-macrophages, les PN, les plaquettes, et possède des motifs activateurs ITAM dans sa partie cytosolique. Son activation déclenche la phagocytose et la sécrétion de cytokines inflammatoires. RFcγIIb est exprimée à la surface des lymphocytes B et possède un motif inhibiteur ITIM, impliqué dans l'inhibition rétroactive des lymphocytes B ;

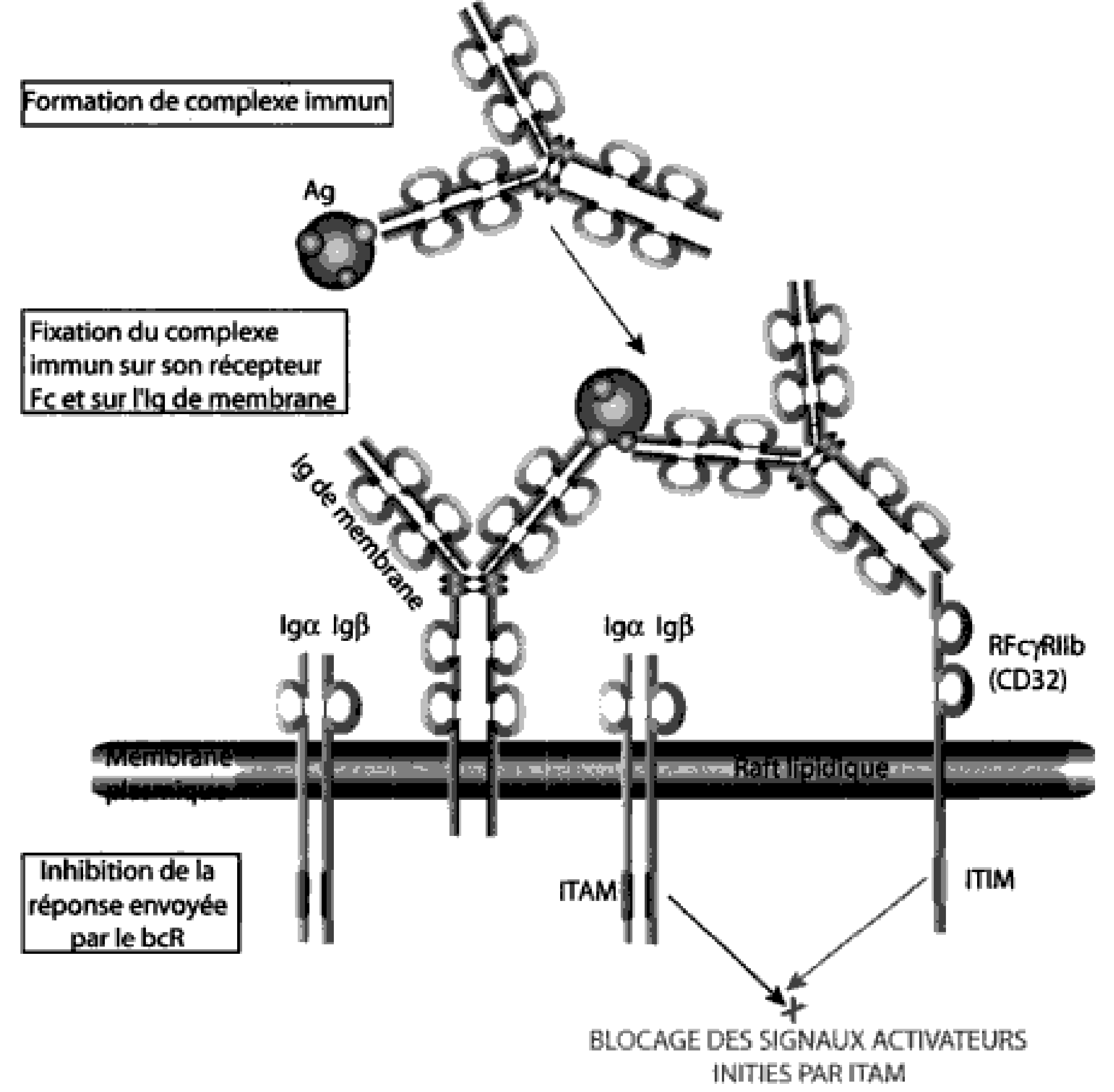


Figure 3. CD32 et régulation négative de la synthèse des Ac par les lymphocytes B. Le domaine cytoplasmique du récepteur FcγRIIb contient dans sa partie cytoplasmique un domaine d'inhibition à base de tyrosine (motif ITIM) qui active un système enzymatique inhibant les signaux activateurs initiés par les motifs ITAM du BcR

- CD40, molécule homodimérique appartenant à la famille du récepteur au TNF (*tumor necrosis factor*), est exprimée sur les cellules B mais aussi sur les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales. CD40 est exprimée de façon constitutive par les lymphocytes B. Elle intervient :
  - dans l'activation des lymphocytes B par les lymphocytes T auxiliaires (*fig.* 4). Le lymphocyte B présente dans sa molécule HLA de classe II des produits de

dégradation des Ag que le lymphocyte B a endocytés. Le TcR du lymphocyte T reconnaît le complexe CMH-peptide. Ainsi activé, le lymphocyte T exprime CD40Ligand (CD40L). L'interaction CD40L-CD40 active en retour le lymphocyte B. Cette interaction provoque aussi l'expression à la membrane du lymphocyte B de CD80 et CD86 (B7-1 et B7-2), molécules de la superfamille des Ig, qui se lie à CD28 du lymphocyte T et amplifie la synthèse de cytokines de ce dernier,

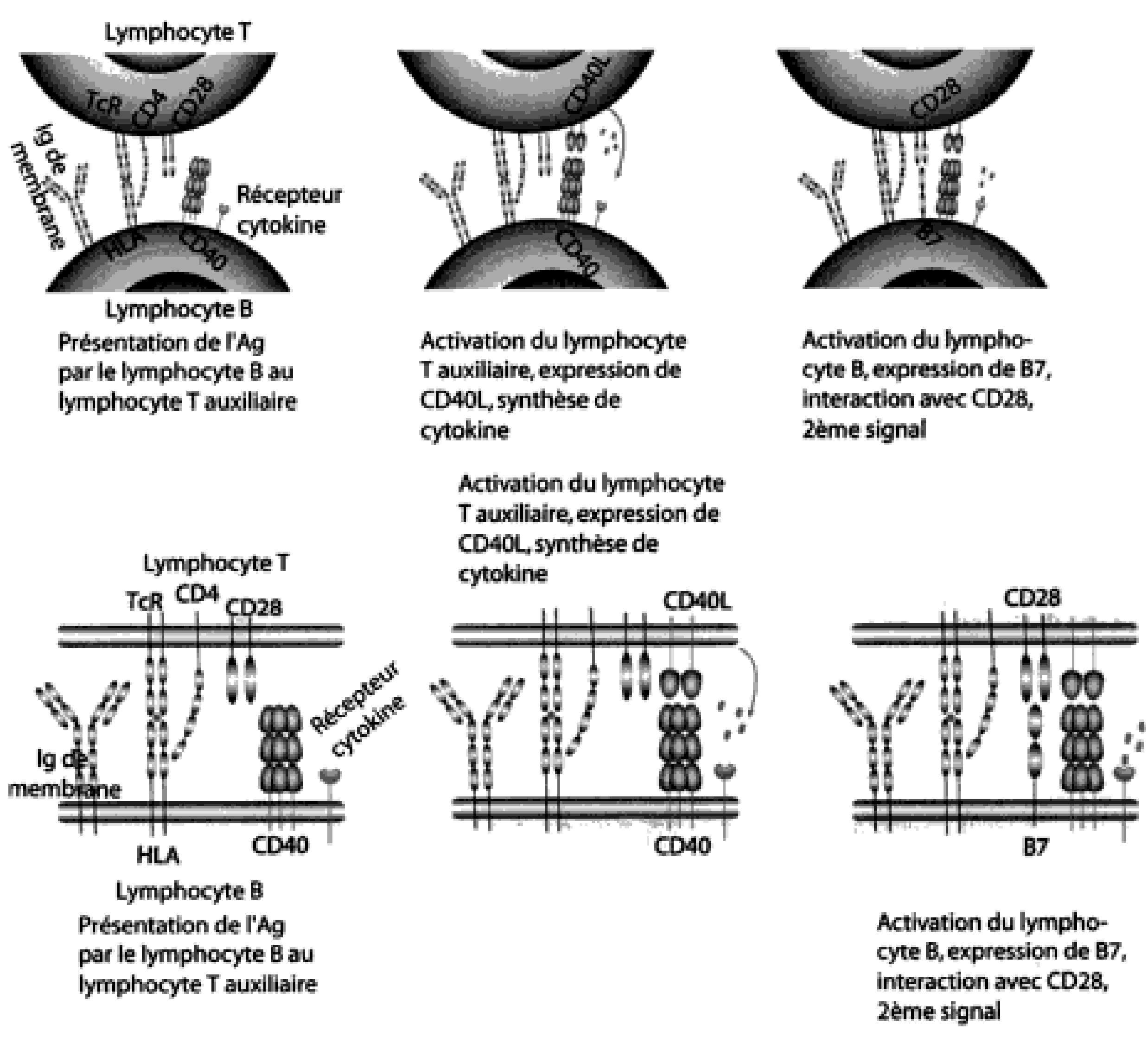


Figure 4. Activation du lymphocyte B par un lymphocyte T auxiliaire. Rôle de l'interaction CD40-CD40L préalable à la délivrance du deuxième signal à travers l'interaction B7-CD28. B7 : B7-1 et B7-2 (CD80 et CD86)

- dans la commutation isotypique (*fig. 5*). Une cellule B va synthétiser séquentiellement des IgM puis des IgG, IgA ou IgE, mais toujours de même spécificité d'Ac, avec la même partie variable codée par la recombinaison des gènes V, D et J. C'est la commutation de classe ou commutation isotypique. Elle résulte de l'interaction CD40 avec CD40L du lymphocyte T, ainsi que de l'ambiance en cytokines ;

• CD27 est une molécule homodimérique appartenant également à la famille du récepteur au TNF. Elle est principalement exprimée par les thymocytes médullaires et les lymphocytes T circulants mais également par une sous-population de lymphocytes B, les lymphocytes B mémoires. Son interaction avec son ligand,

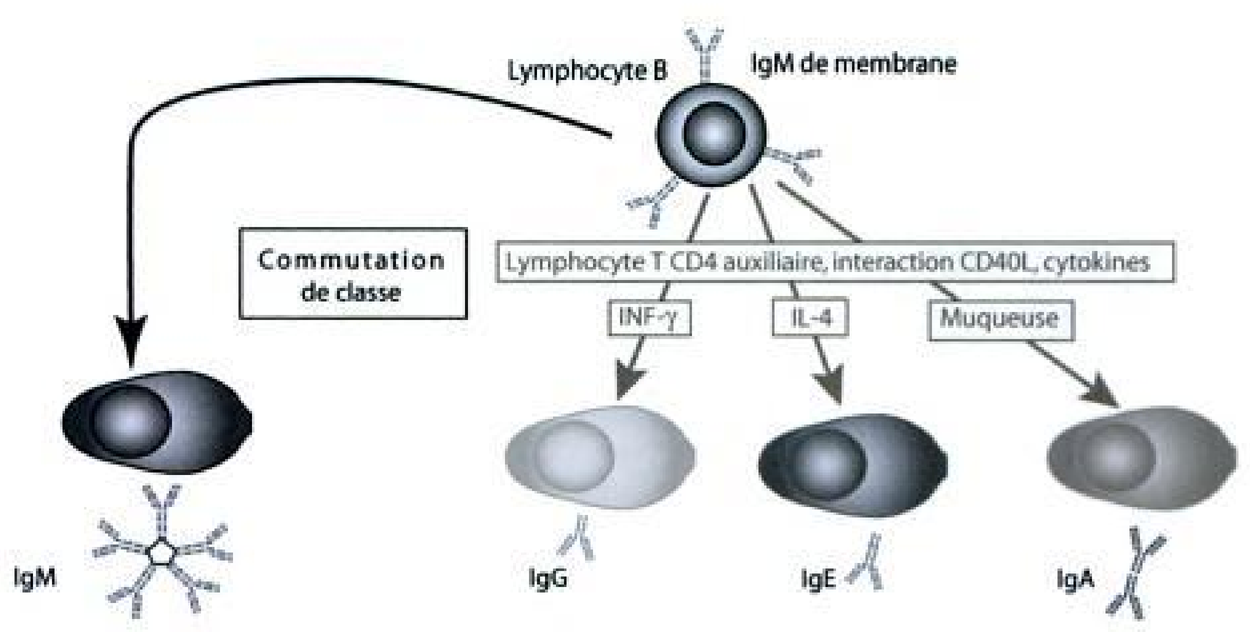


Figure 5. Commutation de classe, rôle de CD40

le CD70, est importante pour la différenciation plasmocytaire T dépendante de ces lymphocytes B ;

- CD5, molécule de signalisation appartenant à la famille des récepteurs scavengers, retrouvée principalement sur les lymphocytes T, sur 5 % des lymphocytes B circulants de l'adulte (lymphocytes B1) et sur la majorité des lymphocytes B du sang du nouveau-né. Les lymphocytes B1 proviendraient soit de la lignée B mais avec un répertoire B différent, soit seraient distincts des cellules B, se développant tôt dans l'ontogénie au niveau des cavités péritonéales et pleurales. Ces cellules joueraient un rôle dans l'immunité naturelle en produisant des anticorps polyréactifs préférentiellement d'isotype IgM, et seraient également responsables de la production des autoanticorps.

En pratique, comme marqueurs de la lignée B, on utilise le plus souvent CD19, CD20, CD22.

C. Différenciation des lymphocytes B

La lymphopoïèse B se déroule dans le foie fœtal jusqu'au deuxième trimestre intra-utérin, puis dans la moelle osseuse. Cette différenciation est sous le contrôle de cytokines, en particulier l'interleukine 7 (IL-7), et d'interactions entre cellules stromales et précurseurs lymphocytaires. Chaque étape se caractérise par l'acquisition ou la perte de molécules de surface ainsi que par des étapes particulières du réarrangement séquentiel des gènes codant pour les parties variables des Ig.

1. Moelle osseuse

Dans la moelle osseuse tout d'abord, on distingue différents stades.

a) Progéniteur des cellules B

Expression à la membrane plasmique des molécules HLA classe II et CD34.

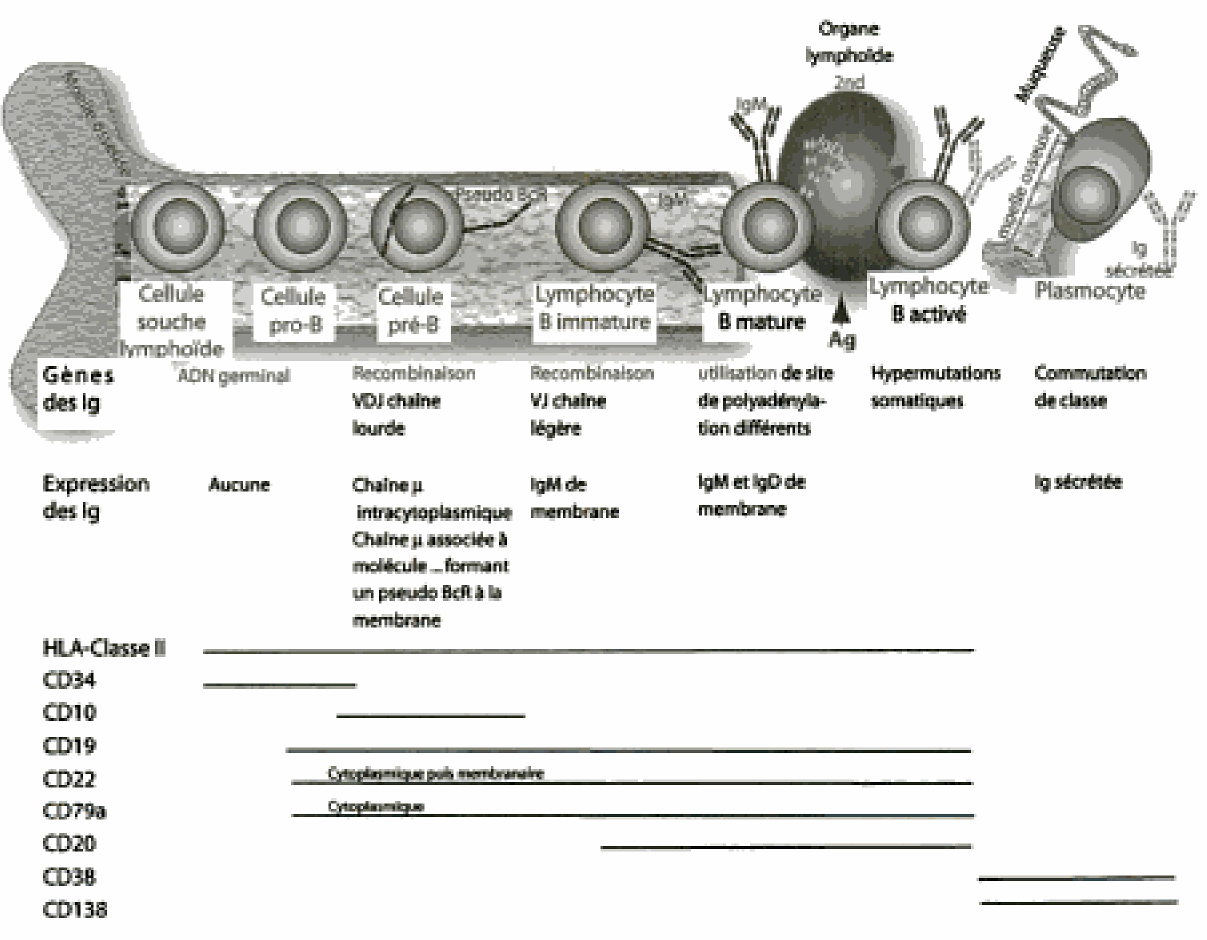


Figure 6. Maturation séquentielle des lymphocytes B

b) Cellule pro B

- Expression de CD34, HLA-DR, CD19, CD22 en intracytoplasmique (cy) et cyCD79a ;
- Réarrangement des gènes encodant pour la chaîne lourde H des Ig.

c) Cellule pré B

- Perte de CD34, expression de HLA-DR, CD19, CD10, CD22 et cyCD79a et acquisition progressive du CD20 ;
- Transcription des gènes qui codent pour la chaîne lourde H des Ig. Expression d'une chaîne µ intracytoplasmique. Une partie est transportée en surface, associée à des molécules de remplacement des chaînes légères formant un pseudo BcR. Il en découle d'une part, l'arrêt de la recombinaison des gènes des chaînes lourdes sur l'autre chromosome. C'est l'exclusion allélique, faisant qu'un lymphocyte B ne peut exprimer que les Ig provenant d'un seul des deux allèles parentaux. D'autre part, les gènes qui encodent la partie variable V des chaînes légères L se réarrangent, κ d'abord, puis en cas d'échec sur les deux allèles κ, les gènes qui encodent la chaîne λ sont réarrangés.

d) Lymphocyte B immature

Perte de l'expression de CD10 et expression d'une IgM de surface et du CD20.

e) Lymphocyte B mature

Une maturation complémentaire produit le lymphocyte B mature qui coexprime alors à sa surface les IgM et IgD, et est capable de répondre à une sollicitation antigénique. Cette maturation se déroule dans la moelle osseuse ou après la sortie du lymphocyte, dans les tissus lymphoïdes périphériques. Le répertoire du lymphocyte B est modelé par sélection négative. Si le BcR reconnaît avec une trop forte affinité une molécule du soi abondamment exprimée dans la moelle osseuse, alors ce lymphocyte meurt par apoptose. Il est cependant possible pour le lymphocyte B de réactiver la recombinase pour générer une seconde chaîne légère et changer la spécificité du récepteur (utilisation de l'autre locus de la chaîne légère), le locus H pouvant aussi subir un autre réarrangement.

Ce processus est appelé *receptor editing* (*fig.* 7). Contrairement aux lymphocytes T, les lymphocytes B possèdent donc une seconde chance de survie si le réarrangement des gènes aboutit à un récepteur capable de reconnaître une structure du soi.

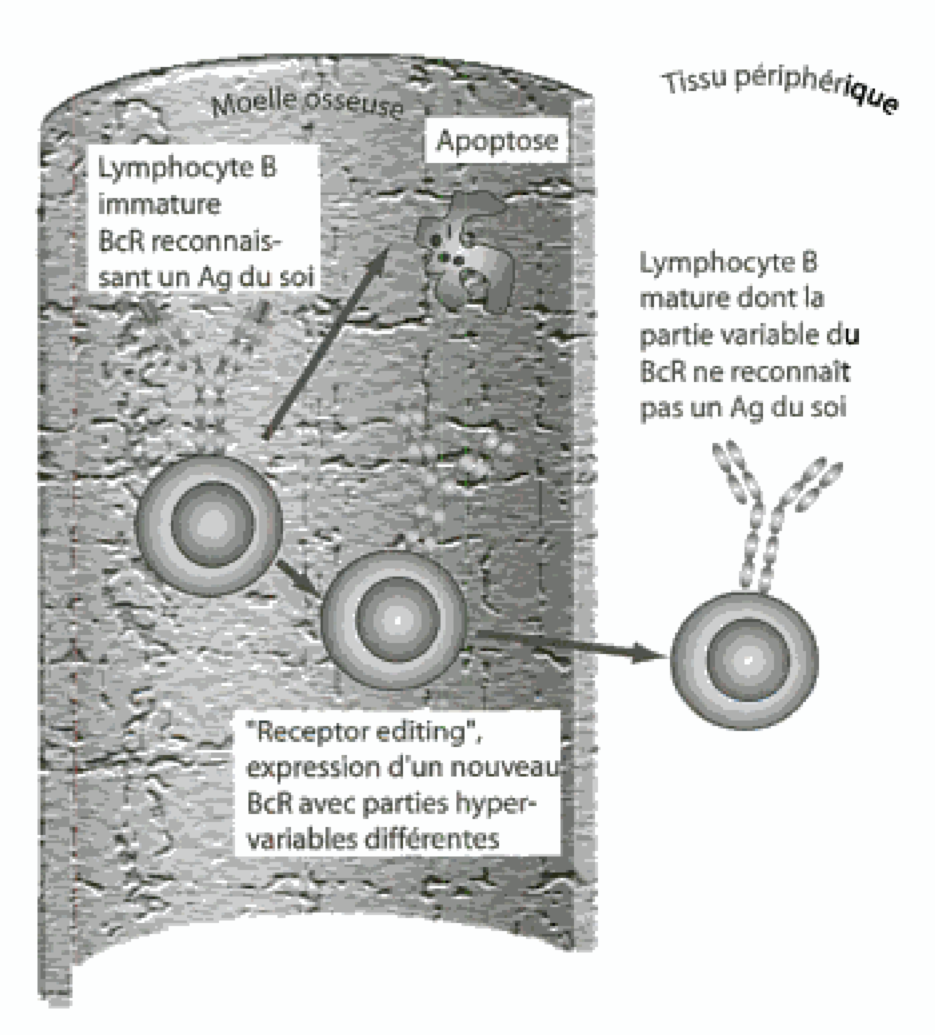


Figure 7. Sélection négative du lymphocyte B (le lymphocyte B, dont le réarrangement des gènes conduit à un BcR reconnaissant un Ag du soi, reçoit un signal d'apoptose) avec possibilité de correction du BcR (*receptor editing*)

2. Dans les organes lymphoïdes secondaires

a) Dans les follicules lymphoïdes primaires

Les lymphocytes B gagnent les follicules lymphoïdes primaires où ils acquièrent une capacité de survie plus longue. L'accès à cette niche de survie implique une compétition entre lymphocytes à BcR non autoréactifs et BcR autoréactifs ayant rencontré leurs auto-Ag. Cette compétition se fait aux dépens des lymphocytes autoréactifs. On remarque donc que contrairement au répertoire T largement expurgé des clones autoréactifs à la sortie du thymus, le répertoire des lymphocytes B à la sortie de la moelle osseuse est encore largement autoréactif. L'auto-immunité fait partie physiologiquement du système immunitaire.

b) Activation du lymphocyte B

À la frontière des zones T et B des organes lymphoïdes, les lymphocytes B coopèrent avec les lymphocytes T et deviennent des plasmocytes sécréteurs d'IgM, surtout. Certains restent dans l'organe lymphoïde, d'autres plasmocytes migrent vers la moelle osseuse et accompliront leur fonction sécrétoire pendant plusieurs mois, voire plusieurs années.

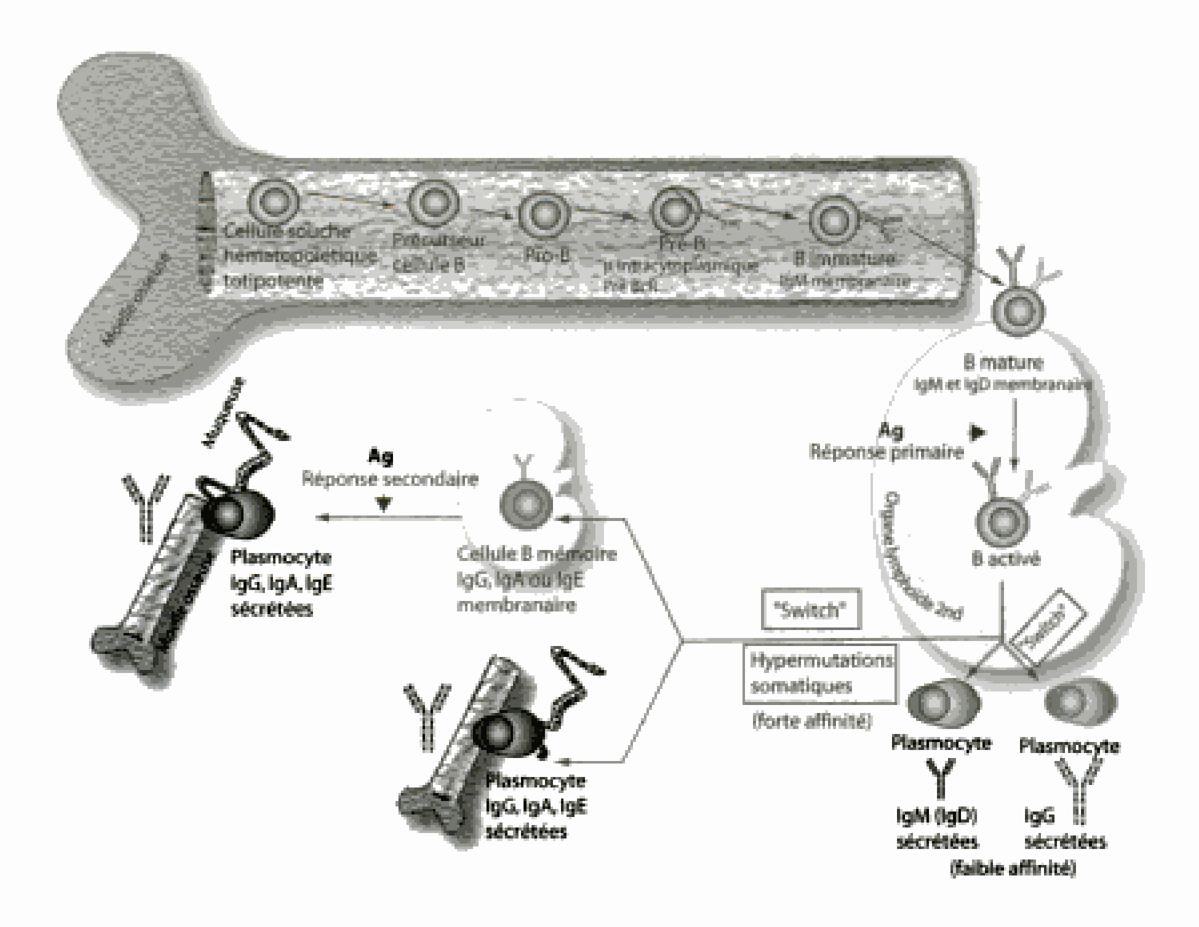


Figure 8. Maturation du lymphocyte B et activation dans les organes lymphoïdes secondaires

Quelques lymphocytes B gagnent les follicules lymphoïdes primaires où ils prolifèrent intensément et forment les centres germinatifs (*fig. 9*). Des hypermutations somatiques dans les gènes qui encodent les régions variables des Ig surviennent. Il s'ensuit des lymphocytes B d'affinité variable pour l'Ag. Se produisent également à

ce stade les commutations de classe, l'orientation vers tel ou tel isotype d'Ac dépendant de l'ambiance en cytokines et de l'interaction CD40-CD40L sur des lymphocytes T auxiliaires.

Dans les follicules lymphoïdes, au contact des cellules dendritiques folliculaires qui présentent à leur surface les Ag sous forme native, les lymphocytes B reçoivent un signal de survie si le résultat des mutations somatiques aboutit à une Ig de membrane de plus forte affinité pour l'Ag.

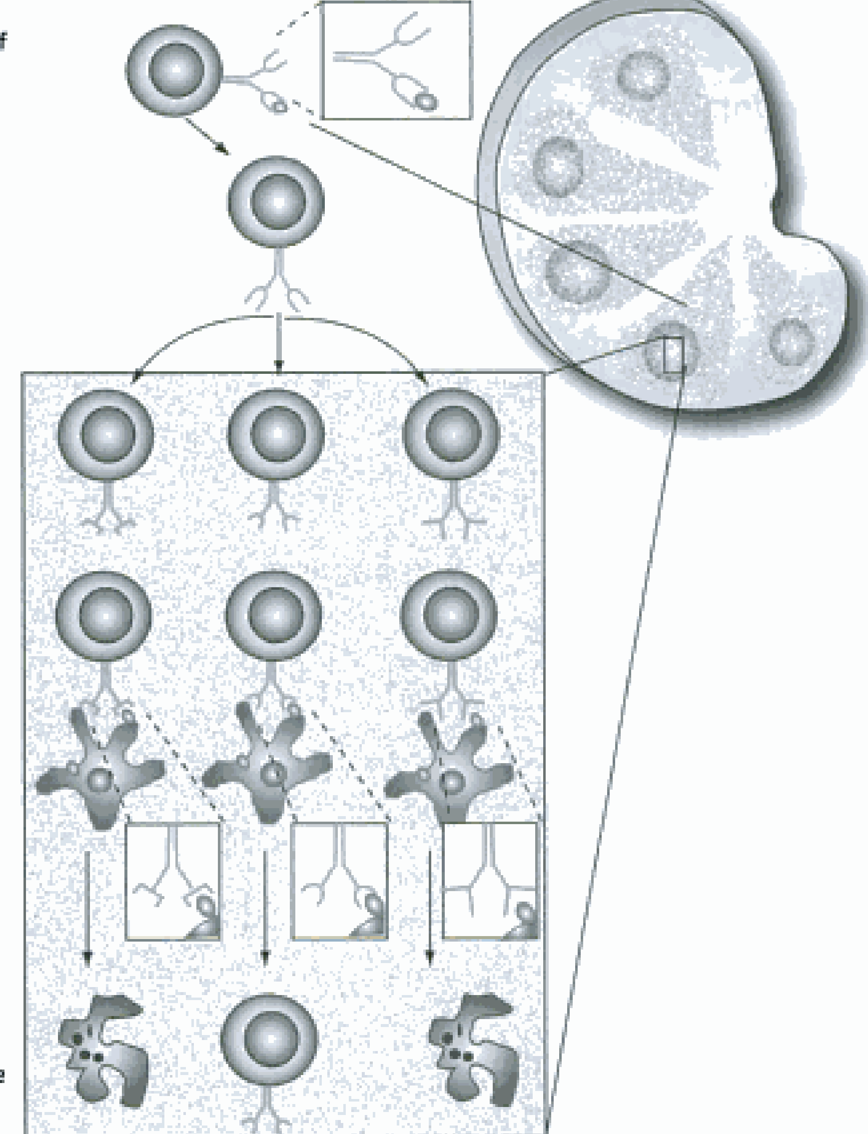


Figure 9. Sélection des lymphocytes B de haute affinité dans les centres germinatifs. Les cellules dendritiques folliculaires présentent, à leur surface et sous forme native, l'Ag fixé par des récepteurs au complément, ou l'Ag sous forme de complexe immun fixé par des récepteurs au fragment Fc. Pendant la prolifération des lymphocytes, des hypermutations surviennent dans les gènes codant pour la partie variable des Ig. Les Ig de membranes résultantes sont « testées » quant à leur affinité pour l'Ag fixé sur ces cellules dendritiques folliculaires. Si le résultat des hypermutations est une Ag de très haute affinité, alors le lymphocyte reçoit un signal de survie. Sinon, il meurt par apoptose. Ce signal survie fait intervenir l'interaction CD40L (sur la cellule dendritique) avec CD40 (sur le lymphocyte B)

Au contraire, les autres lymphocytes B où les mutations ont conduit à une Ig de surface de moindre affinité meurent par apoptose. Les lymphocytes B sélectionnés se transforment :

- soit en cellules mémoires qui ne sécrètent pas d'Ac lors de la réponse primaire mais circulent entre les organes lymphoïdes avec une survie de plusieurs années, prêtes à répondre rapidement si l'Ag est réintroduit ;
- soit en plasmocytes retrouvés dans la moelle osseuse ou dans le tissu conjonctif sous épithélial. Ils perdent les marqueurs des lymphocytes B et acquièrent CD38 et CD138 (ils sont CD19-, CD20-, CD21-, CD22-, HLA classe II-, CD38+, CD138+).

D. Fonctions des lymphocytes B

Deux fonctions principales.

1. Synthèse d'Ac

Après différenciation du lymphocyte en plasmocyte.
En réponse à un Ag thymo-dépendant, la réponse primaire est à IgM principalement, puis réponse secondaire à IgG, IgA, IgE.
En réponse à un Ag thymo-indépendant, la synthèse reste à IgM (le plus souvent).

2. Présentation d'Ag aux lymphocytes T

Des Ag peuvent être fixés spécifiquement par le BcR ou non spécifiquement par le récepteur au fragment Fc des Ig (RFc) ou le récepteur au fragment C3 du complément. Cette fixation entraîne l'endocytose des Ag, leur dégradation et l'expression des peptides immunogènes sur la molécule HLA de classe II (*fig. 10*). Une grande partie des Ag est dite thymo-dépendante et l'activation des lymphocytes B nécessite la coopération des lymphocytes T avec, entre autres, reconnaissance par le TcR des peptides immunogènes.

III. Lymphocytes T

A. Récepteur T ou TcR

Il existe deux types de TcR, hétérodimère d'une chaîne α et d'une chaîne β, ou hétérodimère d'une chaîne γ et d'une chaîne δ. Chaque chaîne du TcR appartient à la super famille des Ig. Le TcR est spécifique et reconnaît un peptide antigénique présenté dans les molécules HLA, ou des lipides ou des glycolipides présentés par des molécules CD1. Cette spécificité de reconnaissance résulte de la recombinaison des gènes encodant la partie variable de chaque chaîne du TcR.
Il existe de nombreuses copies d'un seul type de TcR à la surface d'un lymphocyte T. Le TcR est couplé à un complexe moléculaire appelé CD3, oligomère de chaînes γ, δ et ϵ, associé en dimère $\epsilon\gamma$ et $\epsilon\delta$, eux-mêmes associés à un homodi-

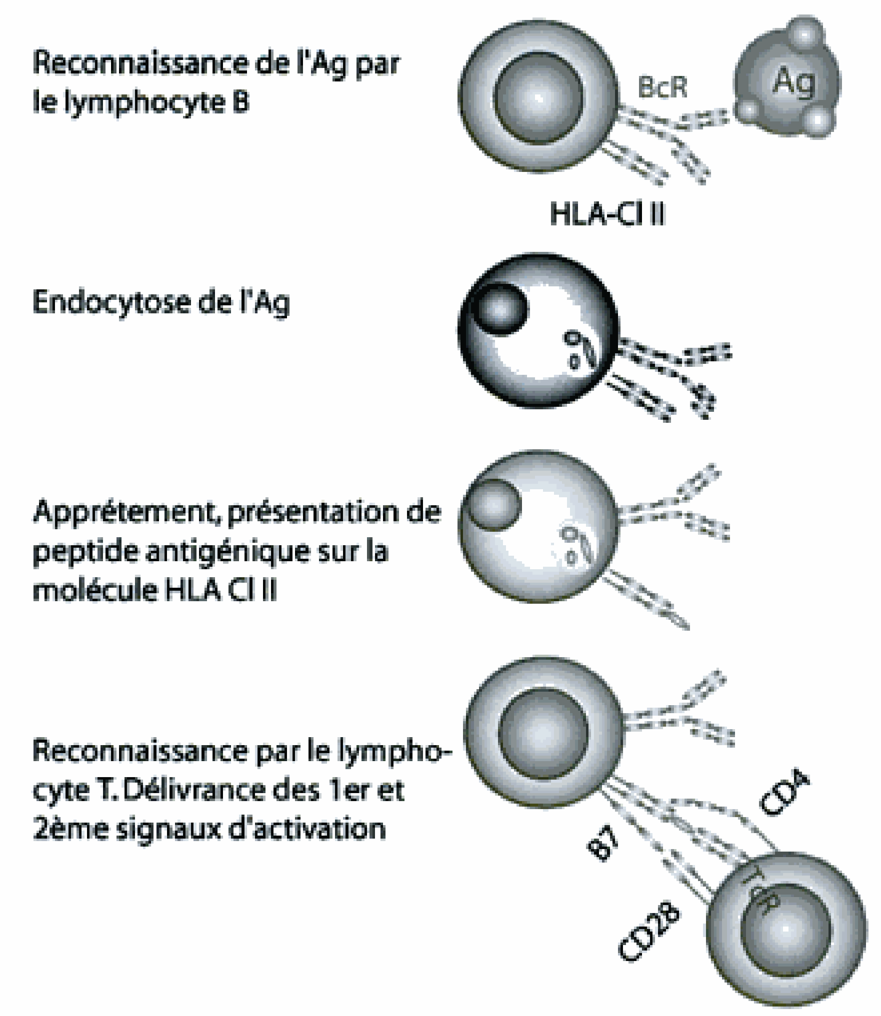


Figure 10. Le lymphocyte B est aussi une cellule présentatrice capable d'exprimer les molécules de co-stimulation. La fixation de l'Ag sur l'Ig de membrane peut déclencher son endocytose, et l'exposition de peptides résultant de sa dégradation dans des molécules de classe II du CMH, préalable à une reconnaissance par les lymphocytes T. Les lymphocytes B reconnaissent des épitopes natifs, conformationnels, alors que les lymphocytes T reconnaissent des fragments peptidiques du même Ag exposés dans les molécules du CMH

mère ζ. L'ensemble assure la transduction du signal d'occupation du TcR par le peptide antigénique. Ces chaînes possèdent dans leur partie cytosolique des motifs riches en tyrosines appelés ITAM (motif d'activation à base de tyrosine des immunorécepteurs). Les tyrosines phosphorylées des chaînes ζ sont le point de départ d'une cascade de phosphorylation aboutissant au recrutement de facteurs de transcription nucléaire et à l'activation du lymphocyte T.

B. Marqueurs de surface importants des lymphocytes T

- TcR, récepteur du peptide antigénique présenté sur la molécule HLA ;
- CD3, ensemble multimoléculaire assurant la transduction du signal d'activation lymphocytaire. C'est un marqueur spécifique des lymphocytes T ;
- CD2 appartient à la super famille des Ig, molécule d'adhésion à CD58 (LFA3). Intervient dans la formation de la synapse immunologique, région de contact entre protéines membranaires redistribuées du lymphocyte T et de la CPAg. CD2 est un marqueur pan T qui apparaît au début de la différenciation thymique

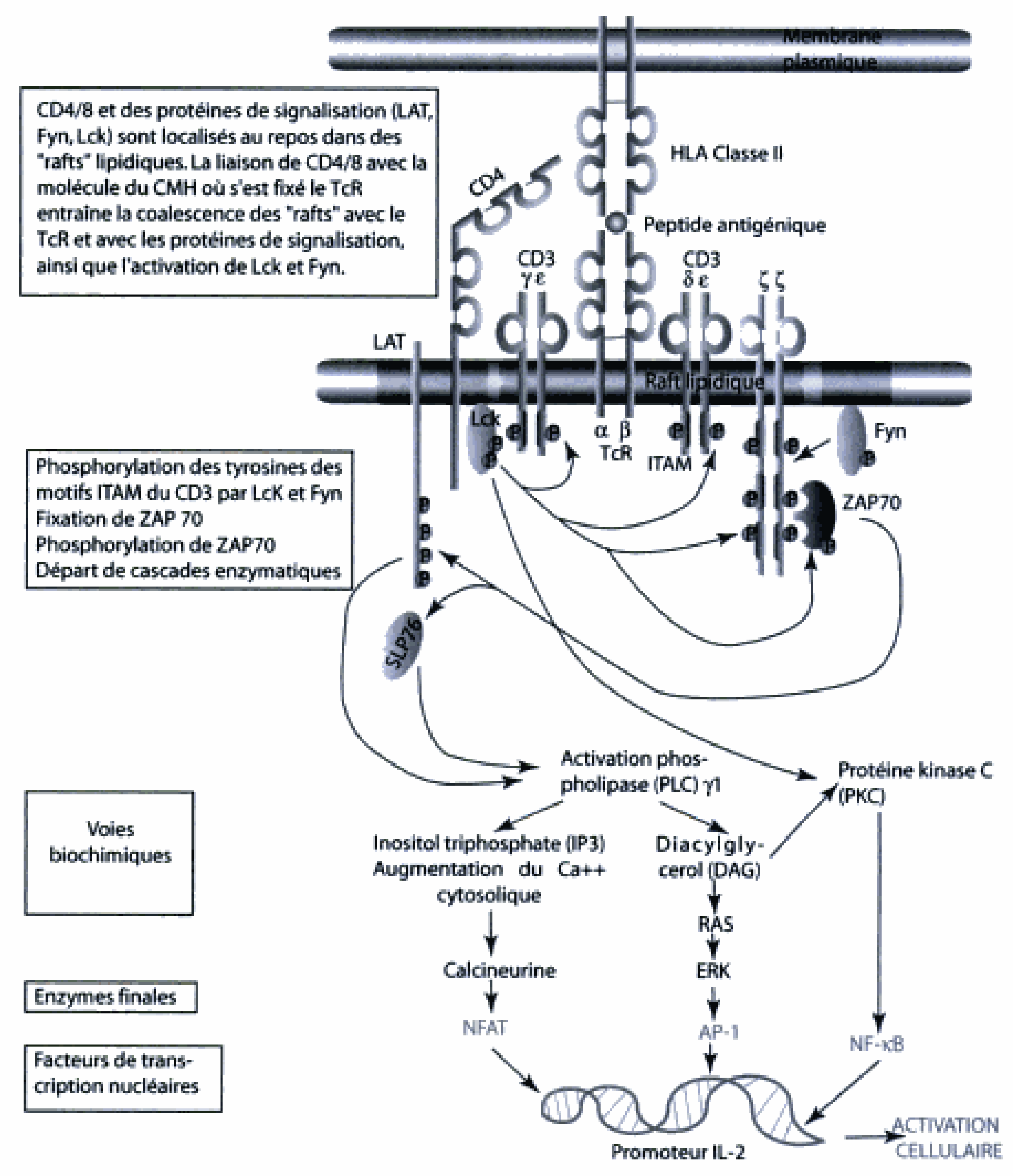


Figure 11. Récepteur T ou TcR. Le signal d'occupation du TcR est transduit par la molécule CD3. Les grandes protéines adaptatrices et les principales voies de signalisation sont mentionnées dans un but indicatif et dépassent le cadre de la question

et se maintient sur tous les lymphocytes matures. CD2 se rencontre aussi sur les cellules NK ;

- CD4 et CD8 appartiennent à la super famille des Ig. CD4 est associé à la reconnaissance de partie monomorphe des molécules de classe II du CMH, et CD8 des molécules de classe I. Ils stabilisent l'interaction entre lymphocytes T et CPAg. Le regroupement des molécules CD4 ou CD8 active une tyrosine kinase fixée à l'extrémité cytosolique de ces molécules, participant à l'activation cellulaire déclenchée par l'occupation du TcR. Il existe classiquement deux fois plus de lymphocytes exprimant CD4 que de lymphocytes exprimant CD8 dans le sang circulant.

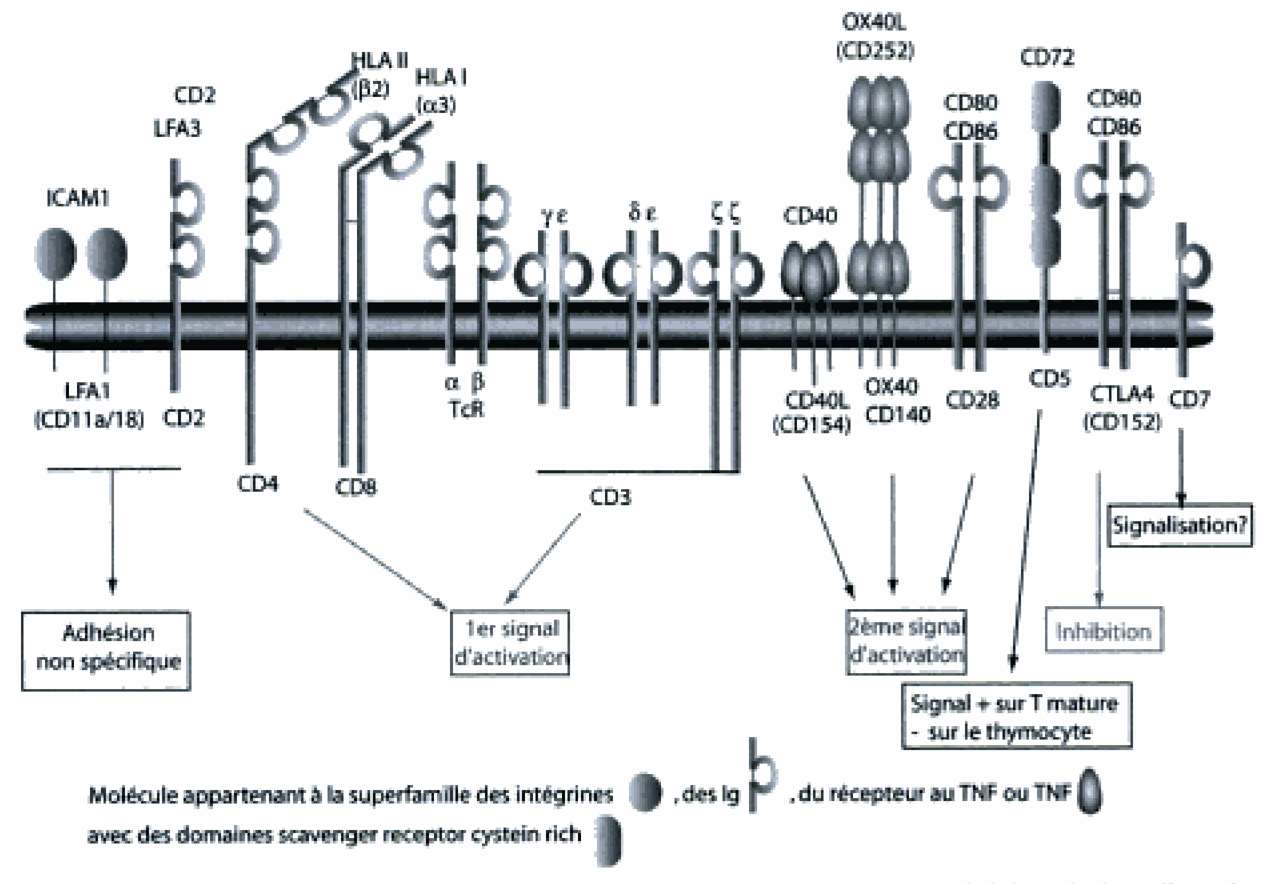


Figure 12. Principales molécules de la surface des lymphocytes T avec précision de leur ligand et participation à l'activation lymphocytaire

Autres molécules de la synapse immunologique :

- LFA1, de la famille des intégrines, hétérodimère α (CD11a) et β (CD18) qui participe à l'adhésion cellulaire en interagissant avec les molécules ICAM ;
- CD28, surtout sur les lymphocytes CD4, récepteur pour les molécules de co-stimulation CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) de la cellule présentatrice. C'est un homodimère appartenant à la super famille des Ig ;
- CD137, sur les lymphocytes CD8 activés. Il serait l'analogue de CD28 sur les lymphocytes CD4 et appartient à la famille des récepteurs au TNF ;
- CD154, ou CD40 ligand (CD40L), homodimère appartenant à la famille des récepteurs au TNF, exprimé sur les lymphocytes T CD4 activés, se lie à CD40 des cellules présentatrices, du lymphocyte B, des macrophages, des cellules endothéliales qu'il active ;
- CD152 ou CTLA4, hétérodimère de la super famille des Ig, apparaît sur les lymphocytes T après activation. Il entre en compétition avec CD28 pour l'interaction avec CD80 et CD86. Mais l'interaction conduit ici à délivrer un signal inhibiteur ;
- CD134 ou OX40, de la famille des récepteurs au TNF. Il transmet un signal de co-stimulation au lymphocyte T, en synergie avec CD28.

C. Différenciation des lymphocytes T

1. Dans le thymus

Les précurseurs proviennent de la moelle osseuse et sont CD34+, HLA classe II+, CD7+. Ils entrent dans la corticale thymique où ils prennent le nom de prothymocytes. Ils sont triples négatifs, n'exprimant ni CD3, ni CD4, ni CD8 (*fig. 13*). Ils acquièrent alors des marqueurs pan T, CD2 puis CD3. Les cellules sont dites doubles négatives.
À ce stade surviennent les réarrangements des gènes encodant les chaînes γ et δ du TcR. Si le gène γ n'est pas inhibé, il est transcrit en même temps que le gène δ, et le lymphocyte exprime le récepteur γδ. Mais le plus souvent, la transcription du gène γ est inhibée et c'est alors le gène β qui est réarrangé et exprimé. La chaîne β résultante est transportée à la membrane plasmique et associée à un substitut de chaîne α, pré-TcRα. Il y a alors réarrangement des gènes qui codent pour la chaîne α du TcR et expression d'un TcRαβ. En parallèle, le thymocyte devient double positif, CD4+CD8+.
Le TcR est alors testé pour sa capacité à reconnaître les molécules du CMH du soi exprimées sur les cellules épithéliales thymiques. C'est la sélection positive. Reçoivent un signal de survie les thymocytes qui ont réarrangé les gènes encodant les chaînes α et β de façon que le TcR reconnaisse les molécules HLA du sujet. Plus de 95 % des thymocytes qui ne reconnaissent pas le CMH du sujet meurent. Si les thymocytes reconnaissent les molécules HLA de classe I, elles perdent CD4 et restent CD8. Inversement, si elles reconnaissent les molécules HLA de classe II, elles perdent CD8 et restent CD4. Elles deviennent alors simples positives, CD4+ ou CD8+.
Puis les thymocytes arrivent à la jonction corticomédullaire du thymus où ils entrent en contact avec des cellules dendritiques. Sont alors éliminés les thymocytes dont le TcR reconnaît avec une trop forte affinité les peptides du soi, présents dans les molécules HLA des cellules dendritiques. L'activation prématurée du lymphocyte entraîne son élimination. C'est la sélection négative. En définitive, entre 95 % et 99 % des thymocytes meurent. Sortent donc du thymus des lymphocytes dont le TcR reconnaît le non-soi sur les molécules HLA du sujet. Le thymus laisse aussi échapper des lymphocytes T avec une affinité pour les Ag du soi, dont des cellules CD4+CD25+ à activité suppressive vis-à-vis des clones auto-immuns.

2. Dans les organes lymphoïdes secondaires

Les lymphocytes T sortent alors du thymus et gagnent les organes lymphoïdes secondaires. Ce sont des lymphocytes naïfs qui n'ont pas encore rencontré l'Ag. Leur durée de vie est longue et ils circulent en permanence entre ces organes lymphoïdes secondaires.
Dans le sang, on trouve des lymphocytes T dont 95 % expriment un TcRαβ, les 2/3 sont CD3+CD4+CD8- et 1/3 CD3+CD4-CD8+. Il existe quelques lymphocytes T à TcRαβ double négative CD3+CD4-CD8- et double positive CD3+CD4+CD8+. 5 % des lymphocytes T expriment des TcR à chaîne γδ (ils sont plus fréquents dans les

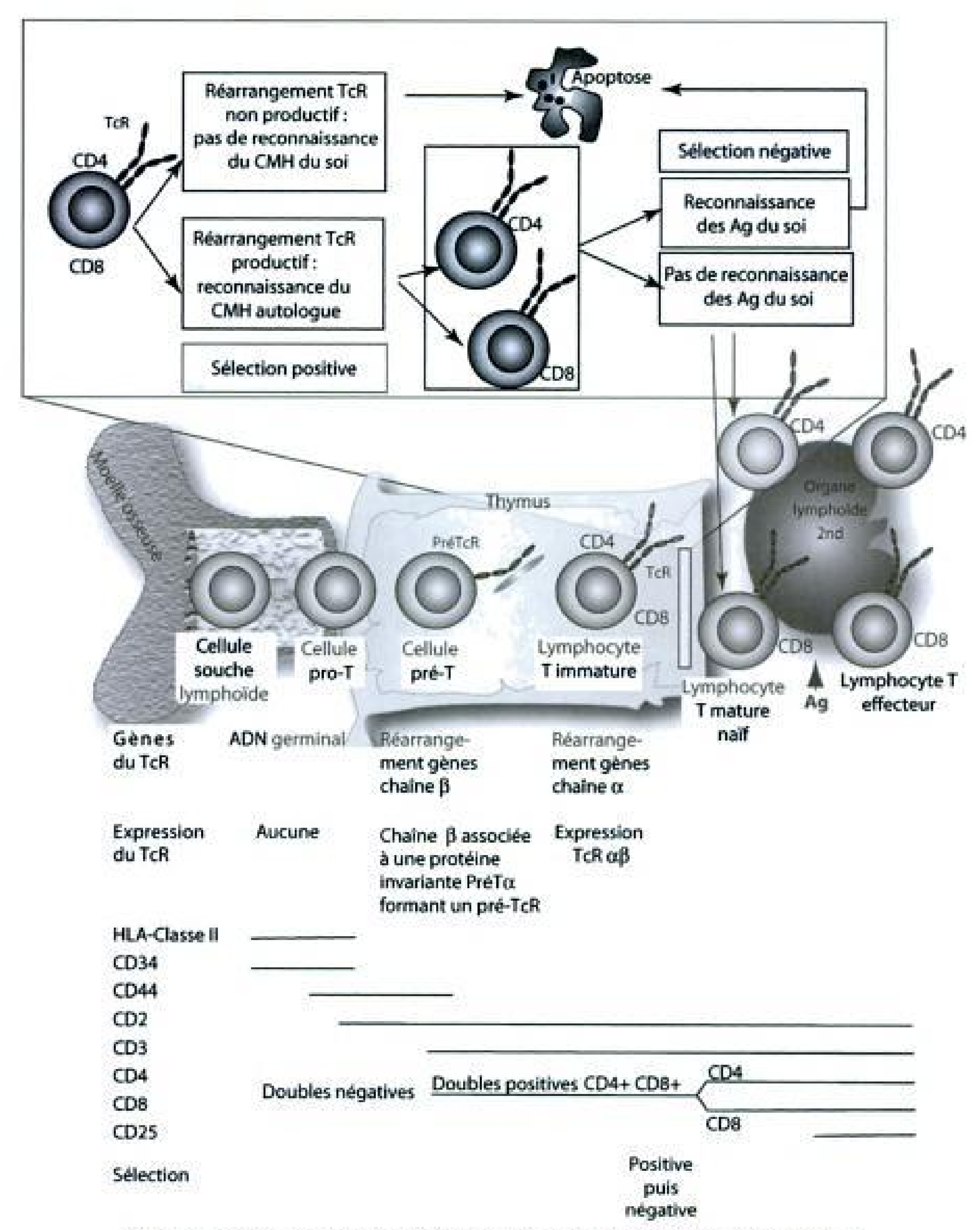


Figure 13. Étapes de la différentiation et de la maturation du lymphocyte T

muqueuses) et sont surtout doubles négatifs CD3+CD4-CD8-, quelques-uns sont CD3+CD4-CD8+faible, mais jamais de CD4+.
Ces lymphocytes T deviendront des cellules effectrices et des cellules mémoires après activation consécutive à la reconnaissance par leur TcR de l'Ag, et à la délivrance d'un deuxième signal.

D. Différentes fonctions des lymphocytes effecteurs

1. T auxiliaires, CD4+

Les cellules TCD4+ se différencient en différentes sous-populations de cellules effectrices qui produisent différents groupes de cytokines :

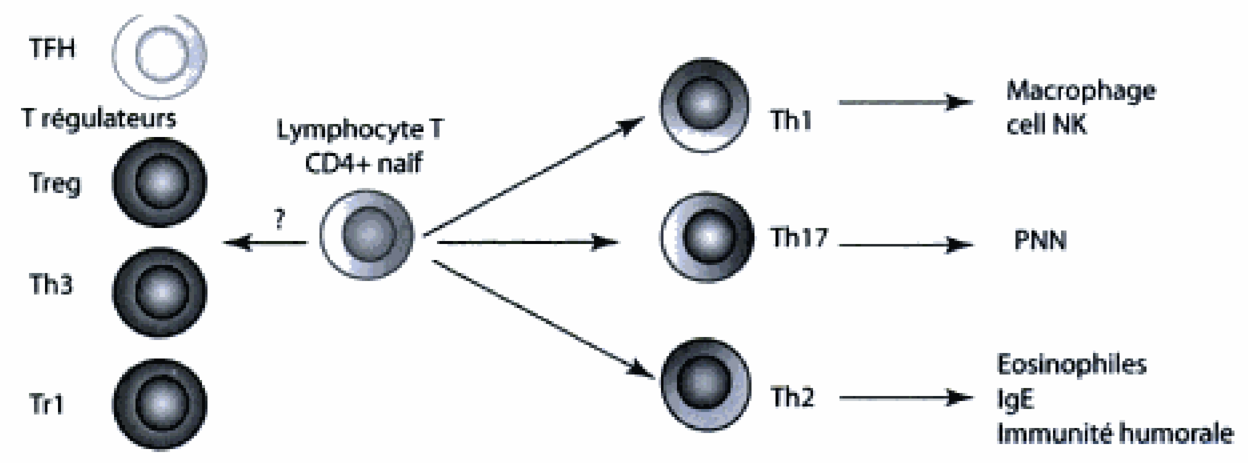


Figure 14. Les différents types de lymphocytes auxiliaires (TFH, *T follicular B helper*). D'après *Curent opinion in immunology*, 2006

a) Lymphocytes Th1

Ils produisent surtout de l'INF-γ (interféron γ), intervenant dans l'activation des macrophages et la régulation des réactions d'hypersensibilité retardée. Ils synthétisent également de grande quantité d'IL-2 et de TNF.

b) Lymphocytes Th2

Ils produisent surtout de l'IL-4 et du TGF-β (*tumor growth factor*). Ils contribuent à développer les réactions humorales, en particulier l'activation des lymphocytes B à IgE et activent les PNE par l'IL-5 qu'ils synthétisent. Ils synthétisent aussi des IL-4, -10, -13 qui inhibent l'activité des macrophages et la voie de différenciation Th1.

La différenciation en CD4 Th1 ou CD4 Th2 dépend des différentes cytokines présentes dans le milieu. En réponse à de nombreux agents bactériens ou viraux, la cellule présentatrice synthétise de l'IL-12 qui oriente le lymphocyte vers la voie Th1. Si, en revanche, l'agent pathogène n'entraîne pas la synthèse d'IL-12, comme c'est le cas par exemple pour les helminthes, les lymphocytes T produisent d'eux-mêmes de l'IL-4 qui devient alors la cytokine prépondérante et l'orientation se fait vers la voie Th2. Les voies Th1 et Th2 sont inhibitrices l'une de l'autre.

c) Lymphocytes Th17

Récemment ont été décrits des Th17 se différenciant sous l'action des IL-6 et TGF-β, et synthétisant les IL-17, IL-6 et TNF-α. L'IL-23 est nécessaire à leur survie. Ils seraient impliqués dans l'activation des polynucléaires neutrophiles.

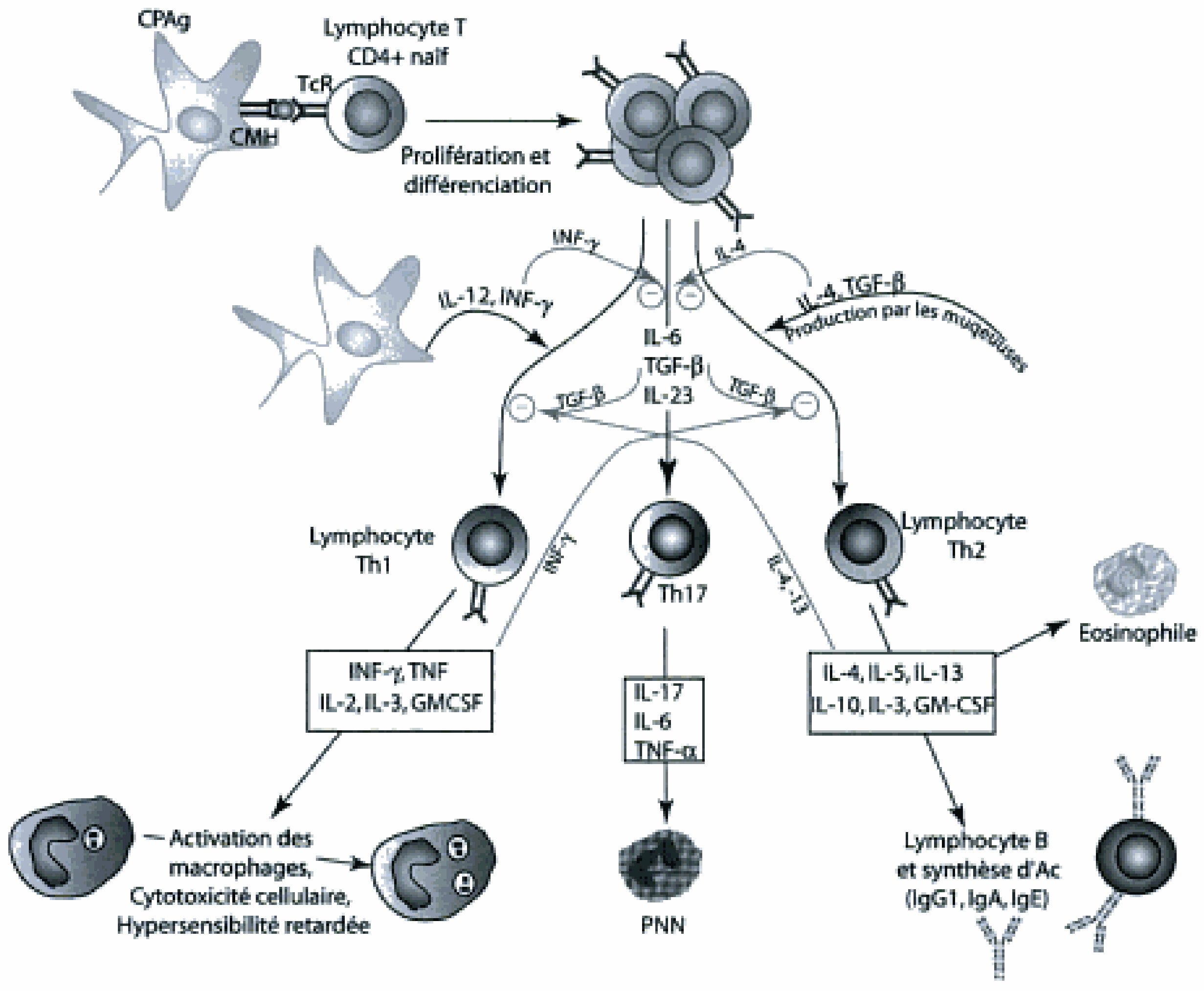


Figure 15. Voies de différenciation Th1, Th2, Th17 et cytokines sécrétées. Cette dernière voie est de développement récent

d) Follicular B helper

Enfin, l'activation des lymphocytes B est classiquement assurée par les Th2. Il semble cependant exister dans les centres germinatifs des cellules appelées *follicular B helper T* (TFH) dérivant peut-être des Th2, capables de reconnaître le peptide présenté par le lymphocyte B, de délivrer le deuxième signal d'activation et d'exprimer CD40L. Ces cellules possèdent le récepteur de chémokine CXCR5, ICOS (*T cell co-stimulator*, équivalent de CD28), CD40L ainsi que SAP (*signaling lymphocytic activation molecule associated protein*).

Les lymphocytes T auxiliaires exercent donc leurs effets par contact direct avec les cellules dendritiques et les lymphocytes B, et par l'intermédiaire de cytokines pour les lymphocytes B, les PNE, les macrophages.

2. Lymphocytes T cytotoxiques (CTL), principalement CD8+

Ils détruisent les cellules que leur TcR reconnaît. Ils sont activés par reconnaissance de l'Ag et molécules de co-stimulation. Les cellules dendritiques activées par les T auxiliaires sont capables, lors d'une rencontre ultérieure avec les CTL, de les activer efficacement.

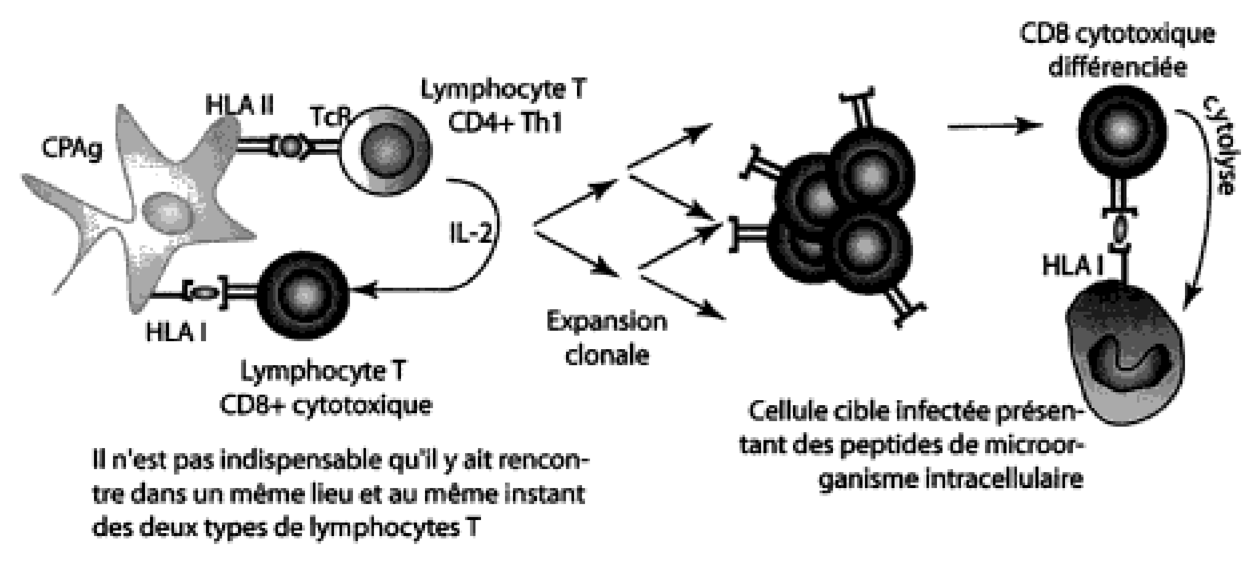


Figure 16. Lymphocytes T cytotoxiques

3. Lymphocytes T régulateurs

C'est une famille complexe. On distingue les lymphocytes T régulateurs naturels des T régulateurs induits.

Les lymphocytes T régulateurs naturels (T reg naturels) CD4+ sont directement issus du thymus, expriment CD25 de façon constitutive et représentent 5 à 10 % des cellules T. Ils exercent une activité suppressive après reconnaissance de l'Ag et contact direct avec le lymphocyte T, par un mécanisme dépendant de CTLA4.

Ils agissent aussi dans une moindre mesure par synthèse de cytokines immunosuppressives IL-10 et TGFβ. Ils expriment sur leur membrane plasmique le récepteur TLR2 (*Toll-like receptor*) au lipopolysaccharide bactérien (LPS). Sa sollicitation freinerait l'activité suppressive, permettant la pleine expansion des cellules effectrices contre le pathogène. Les lymphocytes Tγδ et les cellules NKT font également partie de ces cellules T régulatrices dites naturelles par leur capacité à sécréter des cytokines immunosuppressives.

Les lymphocytes T régulateurs induits, quant à eux, se différencient des CD4 naïfs sous l'influence des cellules dendritiques et des cytokines en donnant des cellules dites Tr1 qui synthétisent de l'IL-10, cytokine à fonction immunosuppressive, ou des cellules dites TH3 qui synthétisent du TGF également à activité suppressive. Certains peuvent se différencier des cellules CD8 et devenir des lymphocytes CD8 régulateurs, associés à des fonctions cytotoxiques mais sécrétant de l'IL-10.

Il existe également des lymphocytes T régulateurs appelés doubles négatifs car ils sont CD3+CD4-CD8-. Ces cellules sont définies par leur capacité à inhiber la réponse immunitaire *via* la mort cellulaire directe des T effecteurs, et cela de façon antigène-spécifique. La mort cellulaire serait médiée par un processus mettant en jeu un contact direct cellule-cellule et par l'interaction Fas/Fas-Ligand.

4. Lymphocytes T mémoires

Ils sont plus performants que les T naïfs lors d'une nouvelle rencontre avec l'Ag. L'isoforme de la molécule CD45, initialement CD45RA, devient CD45RO.

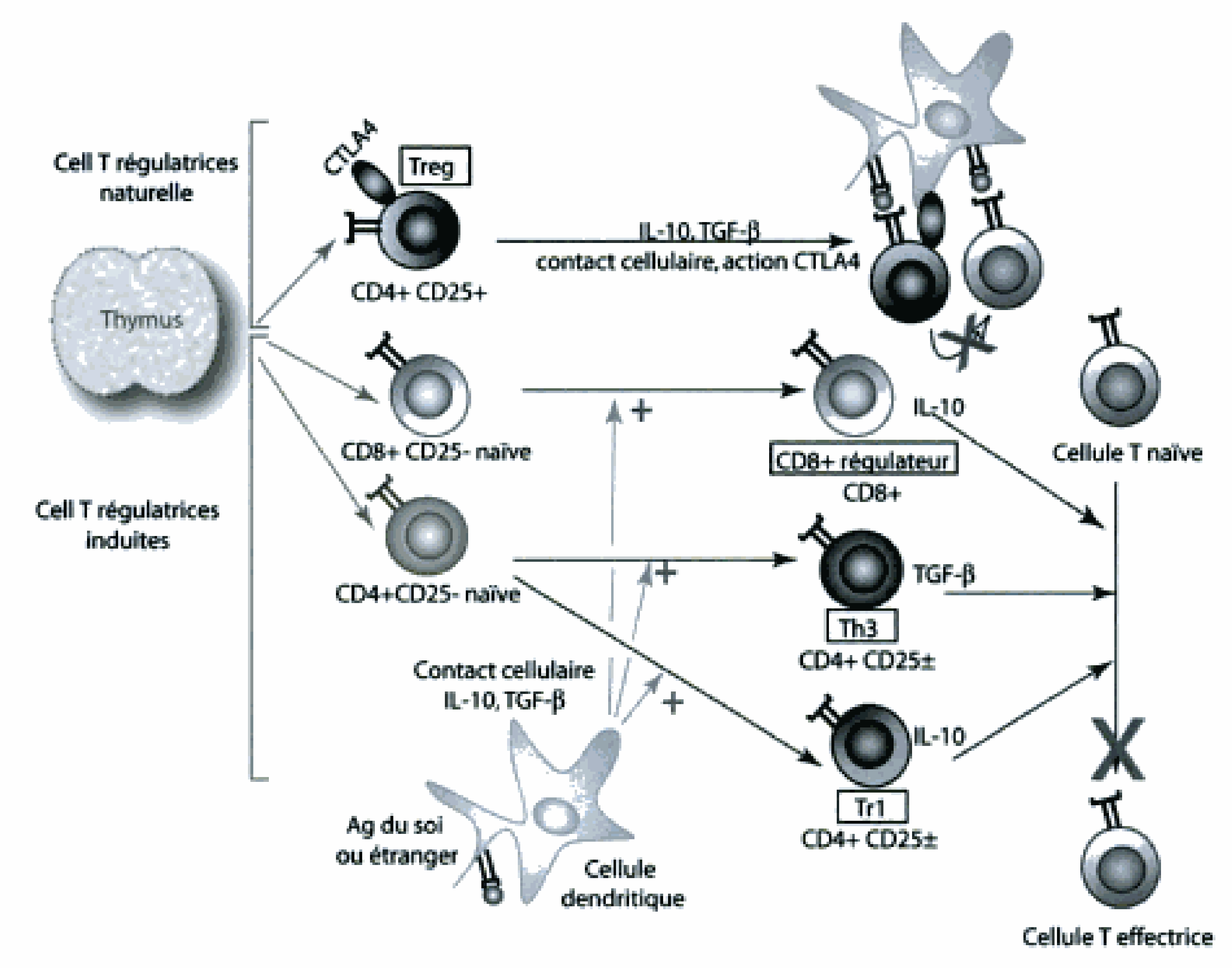


Figure 17. Différents types de lymphocytes T régulateurs. Ils sont spécifiques d'un Ag et agissent par contact direct ou par synthèse de cytokines. D'après *Trend in Immunology*, 2006

E. Lymphocytes T à TcR αβ, γδ et cellules NKT

Les lymphocytes T à récepteur αβ reconnaissent des peptides présentés par les molécules HLA ou des glycolipides présentés par les molécules CD1a, CD1b, CD1c, CD1d.

Les TCR reconnaissant les glycolipides présentés par CD1d ont une chaîne α avec un répertoire très restreint. Une partie de ces cellules porte les marqueurs NK comme CD161 (homodimère de la famille des lectines impliquées dans l'activation) et sont appelées NKT. Elles peuvent être CD4-CD8- et synthétiser les cytokines Th1 ou exprimer CD4+ (60 %) et synthétiser les cytokines Th1 et Th2. Leur TcR est αβ. Leur réactivité serait dirigée vers des lipides autologues. Les lymphocytes NKT seraient surtout impliqués dans des phénomènes de régulation. Les T reg pourraient inhiber l'activité des NKT par contact, alors que les NKT pourraient activer les T reg par synthèse de cytokines. Les NKT pourraient aussi exercer une action suppressive sur les TCD8 et les réponses Th1, avoir un effet variable sur les réponses Th2 et sur les cellules dendritiques immatures qu'elles pourraient rendre tolérogènes.

Les lymphocytes T à récepteur γδ sont CD4-CD8-, parfois CD8+faible, ont un répertoire de reconnaissance limité. Ils reconnaissent parfois des glycolipides présentés par les molécules CD1a, CD1b, CD1c mais la plupart du temps, la recon-

naissance ne semble pas restreinte par le CMH. Ils reconnaissent aussi des molécules de stress reconnues par le TCR γδ ou par des récepteurs particuliers également présents sur les cellules NK (comme les récepteurs à MICA et MICB). On les rencontre en particulier au niveau des épithéliums muqueux et cutanés où ils représenteraient une première ligne de défense. Leur activité est surtout cytotoxique.

IV. Lymphocytes *natural killer* NK

A. Origine

Ils ont un précurseur commun avec les lymphocytes T, une grande partie d'entre eux expriment CD2 mais leur différenciation finale se fait dans la moelle osseuse. Ils sont abondants dans la rate et la moelle osseuse, le foie (1/3 des lymphocytes), les foyers inflammatoires et le sang périphérique où ils représentent 5 à 15 % des cellules mononucléées. Ce sont des lymphocytes de grande taille.

B. Marqueurs de surface importants des lymphocytes NK

- CD2, molécule d'adhésion, marqueur pan lymphocytaire T, présent à la surface des lymphocytes NK ;
- CD7, marqueur pan lymphocytaire T, présent à la surface des lymphocytes NK ;
- CD8 faible, trouvée sur la moitié des cellules NK ;
- CD16, récepteur de faible affinité au fragment Fc des IgG, RFcγIII. Présent aussi sur les macrophages et les mastocytes. C'est un récepteur de la superfamille des Ig ;
- CD56, molécule d'adhésion de la famille N-CAM appartenant à la superfamille des Ig.

En pratique, les cellules NK sont CD16+, CD56+, CD7+, CD2+, certaines CD8+faible. Elles sont CD3-, CD4-, CD19-, CD20-, TcR-.

C. Fonctions des lymphocytes NK

Elles ont été décrites à l'origine comme capables *in vitro* de tuer certaines lignées tumorales sans immunisation préalable. Ce sont des effecteurs de l'immunité naturelle impliqués dans les défenses de l'hôte au cours des phases précoces des infections à pathogènes intracellulaires, virus, certaines bactéries et parasites. Elles assurent aussi la destruction des cellules cancéreuses.

1. Circonstances d'activation

Elles peuvent être activées par des cellules allogéniques ou xénogéniques (qui expriment des molécules du CMH différentes de celles de l'hôte), par des cellules

du soi avec un défaut d'expression des molécules HLA de classe I (absence de soi), ou par des cellules exprimant des molécules de stress (soi altéré).
Elles peuvent aussi être activées par les cytokines produites lors d'une réaction inflammatoire.

2. Fonctions

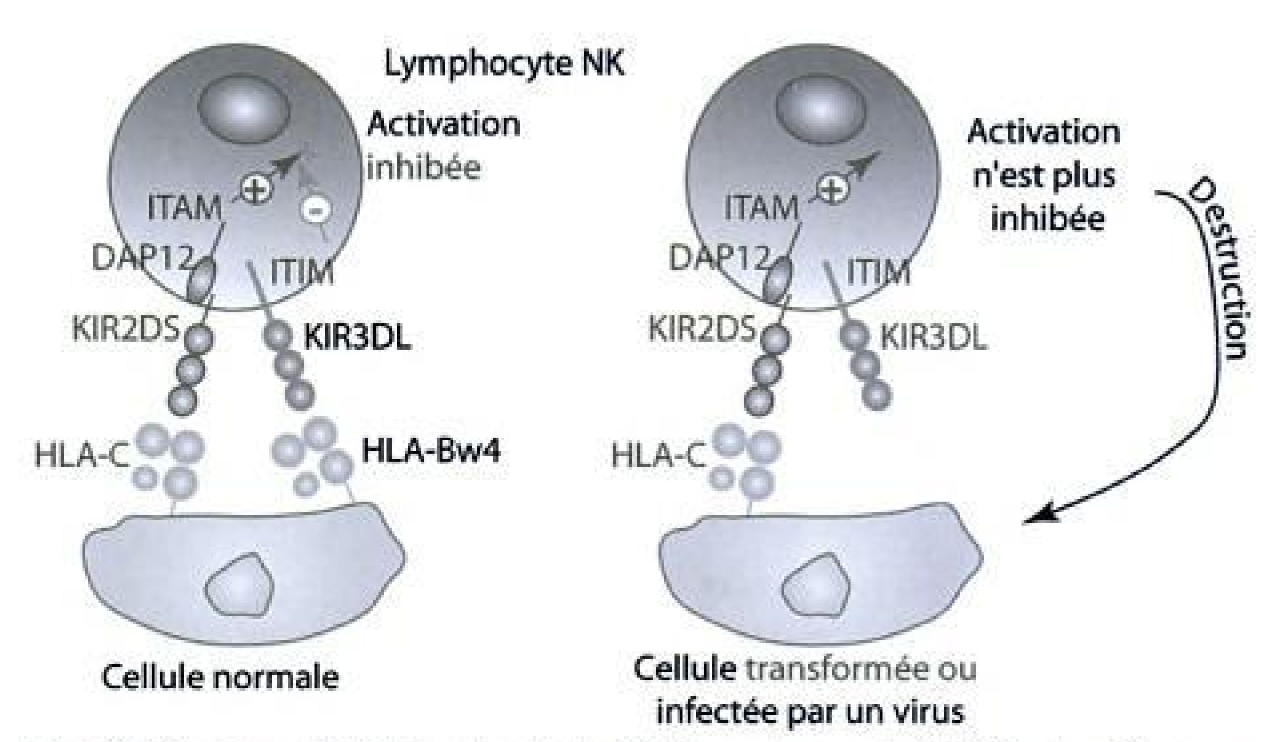


Figure 19. Mécanisme d'activation des cellules NK. Dans cet exemple, KIR2DS est activé par son interaction avec HLA-C mais son effet est contrebalancé par KIR3DL qui reconnaît HLA-BW4. Dans une cellule transformée ou une infection virale, ce dernier allèle peut être perdu. L'effet activateur de KIR2DS n'est alors plus contrebalancé et la cellule exerce son effet cytotoxique sur la cellule transformée
ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif.
ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif.

a) Récepteurs activateurs

- Récepteurs KIR de la superfamille des Ig (KIR, *killer cell Ig-like receptor*). Il existe plusieurs gènes encodant pour les protéines KIR. Certaines sont activatrices, d'autres inhibitrices. Parmi les récepteurs KIR activateurs, les mieux connus reconnaissent une partie monomorphe de la molécule de classe I du CMH, HLA-C, quel que soit le peptide présenté. Ils ne possèdent pas de séquence ITAM ou ITIM, mais la transduction du signal est assurée par une protéine adaptatrice DAP12 à motif ITAM.
- Récepteurs lectiniques, complexe CD94/NKG2C. Le complexe CD94/NKG2C se lie aux molécules HLA-E qui fixent les peptides leaders des autres molécules HLA de classe I. La transduction du signal est là aussi assurée par les protéines adaptatrices DAP12.
- Récepteurs NCR (*natural cytotoxicity receptor*), dont les ligands sont mal connus (hémagglutines virales). Ils appartiennent à la super famille des Ig.
- Récepteur NKG2D aux protéines de stress MICA, MICB, exprimé par les cellules infectées par des virus ou transformées. D'autres protéines (ULBP) de structure également similaire aux molécules de classe I peuvent être reconnues par ce récepteur. La transduction du signal est assurée par une protéine DAP10.
- Récepteur RFcγIII, CD16, active la cellule NK après fixation de complexes immuns. La cellule NK est douée d'ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac).

- Récepteurs TLR3 et TLR9, de la famille des *Toll-like receptors*, détaillés avec les cellules dendritiques. Ces récepteurs reconnaissent respectivement l'ARN viral double brin et les séquences d'ADN bactérien CpG non méthylées. L'interaction avec leur ligand active les cellules NK.

b) Récepteurs inhibiteurs

- Récepteurs KIR. Beaucoup de ces récepteurs sont inhibiteurs, spécifiques des allèles des molécules HLA de classe I, HLA-A, -B, -C dont ils reconnaissent des parties monomorphes. L'interaction ne se fait pas avec le peptide antigénique. Ils possèdent dans leur partie cytosolique une ou plusieurs séquences ITIM (récepteur immunologique inhibiteur dépendant de la tyrosine). Aucune protéine adaptatrice ne transduit donc le signal. Après interaction du récepteur, les tyrosines des motifs ITIM sont phosphorylées et se lient à des tyrosines phosphatases cytosoliques permettant leur activation. Ces phosphatases retirent les phosphates des molécules de signalisation, s'opposant ainsi à la délivrance d'un message activateur.
- Un clone de cellules NK n'exprime en général qu'un type de récepteur inhibiteur KIR, capable de détecter l'absence isolée d'un allèle HLA. Lorsqu'un lymphocyte NK exprime un KIR activateur et un KIR inhibiteur de même spécificité, c'est l'effet inhibiteur qui domine.
- Récepteurs lectiniques, complexe hétérodimérique CD94/NKG2A/B. Ils reconnaissent des parties monomorphes de la molécule HLA-E. Les molécules NKG2A/B possèdent des séquences ITIM dans leur partie cytosolique. Là aussi, lorsqu'un lymphocyte NK exprime les récepteurs lectiniques activateurs et inhibiteurs, c'est l'effet inhibiteur qui l'emporte. Par ailleurs, l'effet inhibiteur peut être supprimé lorsque la molécule HLA-E remplace les peptides leaders des molécules HLA par des produits de dégradation de molécules de stress HSP (*heat shock protein*). Dans ces situations de stress, le récepteur inhibiteur ne peut plus interagir avec HLA-E et c'est le récepteur activateur qui domine.
- Récepteur ILT (ou LIR) de la super famille des Ig, reconnaissant différents allèles de classe I du CMH, HLA-A, -B, -C, -E, -F. Ils possèdent des motifs ITIM.

Par conséquent, lorsque des récepteurs inhibiteurs rencontrent des molécules HLA du soi, ils inactivent les cellules NK. Certains virus bloquent l'expression des molécules de classe I, les rendant insensibles à la destruction par les cellules T cytotoxiques. Mais les récepteurs inhibiteurs des lymphocytes NK ne sont plus stimulés et les cellules activées par des récepteurs aux molécules de stress vont détruire ces cellules infectées.

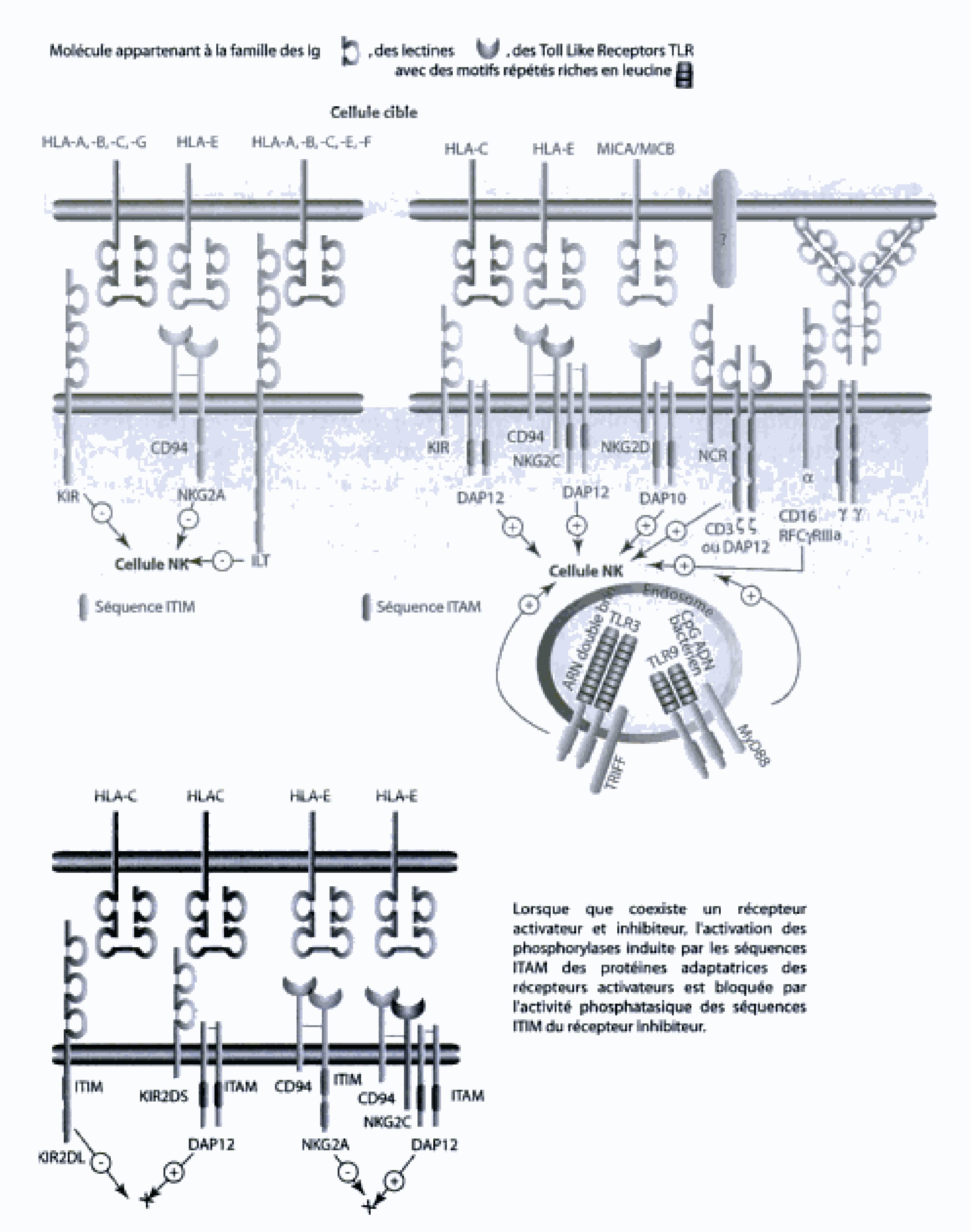


Figure 20. Récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK

V. Cellules dendritiques

A. Cellules dendritiques tissulaires

1. Origine

Elles constituent une population hétérogène. Il n'y a pas de lignage spécifique, certaines dérivent de la lignée myéloïde, d'autres de la lignée lymphoïde. Elles peuvent aussi provenir de cellules sanguines différenciées comme les monocytes sous l'effet de certaines cytokines.
Elles se rencontrent dans les épithéliums au contact direct des micro-organismes, la peau, les tractus gastro-intestinaux et respiratoires. Elles représentent moins de 1 % des cellules mononucléées du sang.

2. Différentiation et fonctions

Leurs fonctions dépendent de leur stade de différenciation.

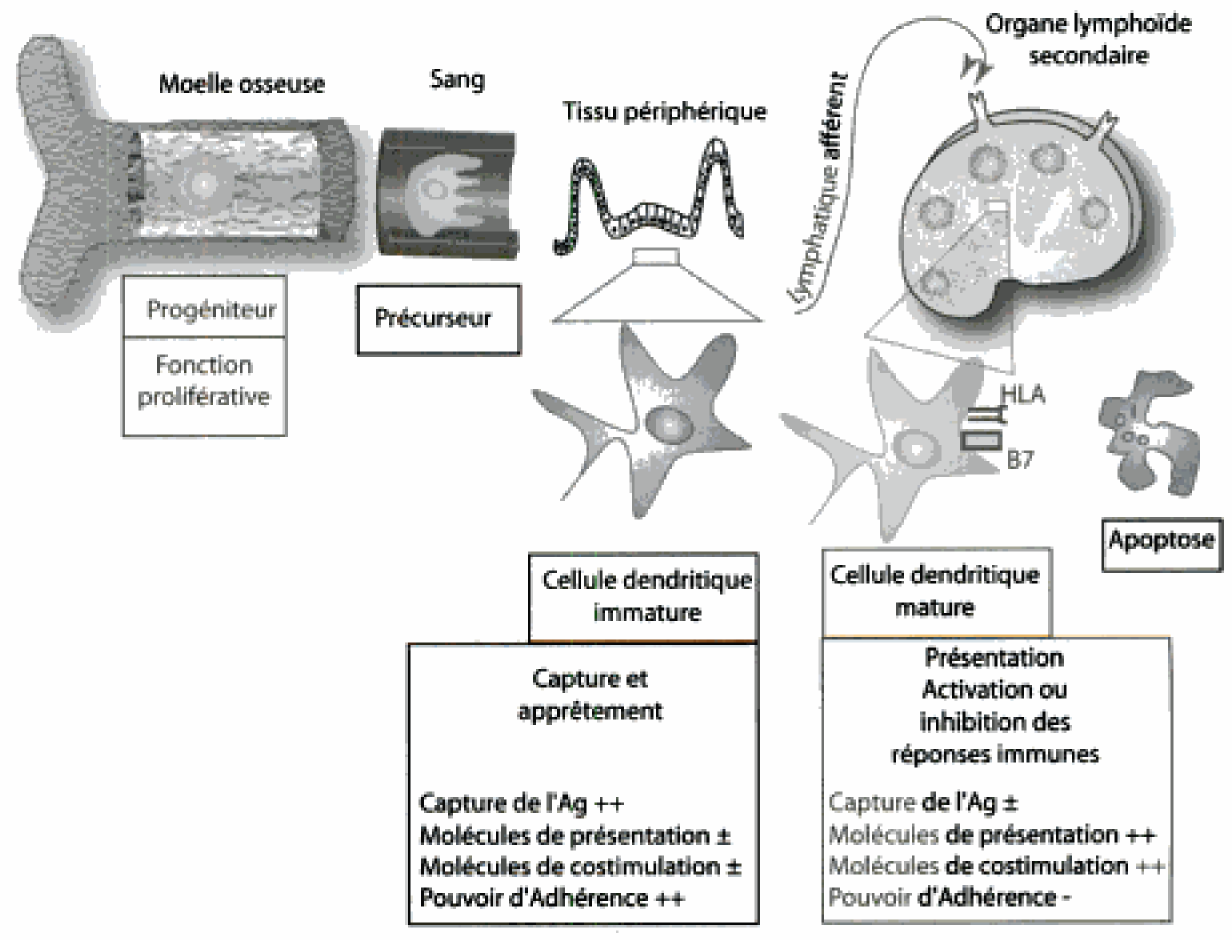


Figure 21. Différenciation et maturation des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques immatures se situent dans les épithéliums qu'elles quittent après capture de l'Ag. Attirées par les chémokines, elles migrent vers les ganglions lymphatiques régionaux ou elles arrivent matures, capables de présenter aux lymphocytes T naïfs l'Ag qu'elles ont apprêté

a) Immatures dans les tissus périphériques

En provenance de la moelle osseuse, elles gagnent la peau et les muqueuses digestive et respiratoire. Dans le derme, elles prennent le nom de cellules de Langerhans, caractérisées en microscopie électronique par une formation appelée granule de Birbeck. Elles sont attirées dans le derme par une chémokine, CCL20, dont elles possèdent un récepteur CCR6.
Elles exercent une fonction de surveillance et leur capacité de capture et d'endocytose est maximum. Elles expriment peu les molécules HLA de classe II ni les molécules de co-stimulation.

b) Matures dans les tissus lymphoïdes où elles présentent l'Ag

Après avoir capturé l'Ag, elles migrent dans les tissus lymphoïdes où elles sont alors à un stade mature. Elles acquièrent le récepteur CCR7 permettant de répondre aux sollicitations de chémokines sécrétées par l'endothélium lymphatique. Aux lymphocytes T naïfs, elles présentent l'Ag sous forme dégradée dans les molécules du CMH qu'elles se mettent à exprimer fortement. Elles expriment aussi les molécules délivrant le deuxième signal d'activation, CD80, CD86, CD40. Elles perdent leur capacité d'endocytose. Elles synthétisent des cytokines, dont l'IL-12. Elles meurent ensuite par apoptose.

3. Place des cellules dendritiques dans la réponse immune

Les cellules dendritiques sont les chefs d'orchestre de la réaction immunitaire.

- Elles initient les réponses spécifiques en activant les T naïfs et T mémoires. Ce sont les cellules professionnelles de la présentation. Elles orientent la réponse vers la voie Th1 par la synthèse d'IL-12 ;
- Elles interviennent également dans l'immunité innée en inhibant la réplication virale par la synthèse d'interféron α, (INF-α), en activant les macrophages et les cellules NK par l'INF-γ. Les cellules dendritiques interagissent de façon optimale avec les autres cellules de l'immunité et jouent un rôle déterminant dans l'initiation, la modulation des réponses spécifiques et non-spécifiques ;
- Enfin, elles jouent un rôle dans l'induction de la tolérance. Elles présentent les auto-Ag dans le thymus lors de la sélection positive. En périphérie, elles seraient également capables de présenter des complexes CMH-peptide aux lymphocytes T, et d'établir une tolérance de ces lymphocytes T vis-à-vis de l'Ag présenté. Ces mécanismes sont mal connus (absence de synthèse d'Il-12, blocage du cycle cellulaire T ?).

4. Récepteurs des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques tissulaires expriment sur leur membrane plasmique ou dans le cytoplasme des récepteurs capables de reconnaître des structures moléculaires dangereuses pour l'organisme, aboutissant à l'endocytose ou à la transduction de signaux alertant la cellule dendritique.

a) Récepteurs PRR aux structures PAMP

La détection des pathogènes peut se faire par des récepteurs nommés PRR (*pattern recognition receptors*) reconnaissant des structures moléculaires partagées par de nombreux micro-organismes (PAMP, *pathogen associated molecular pattern*). Dans

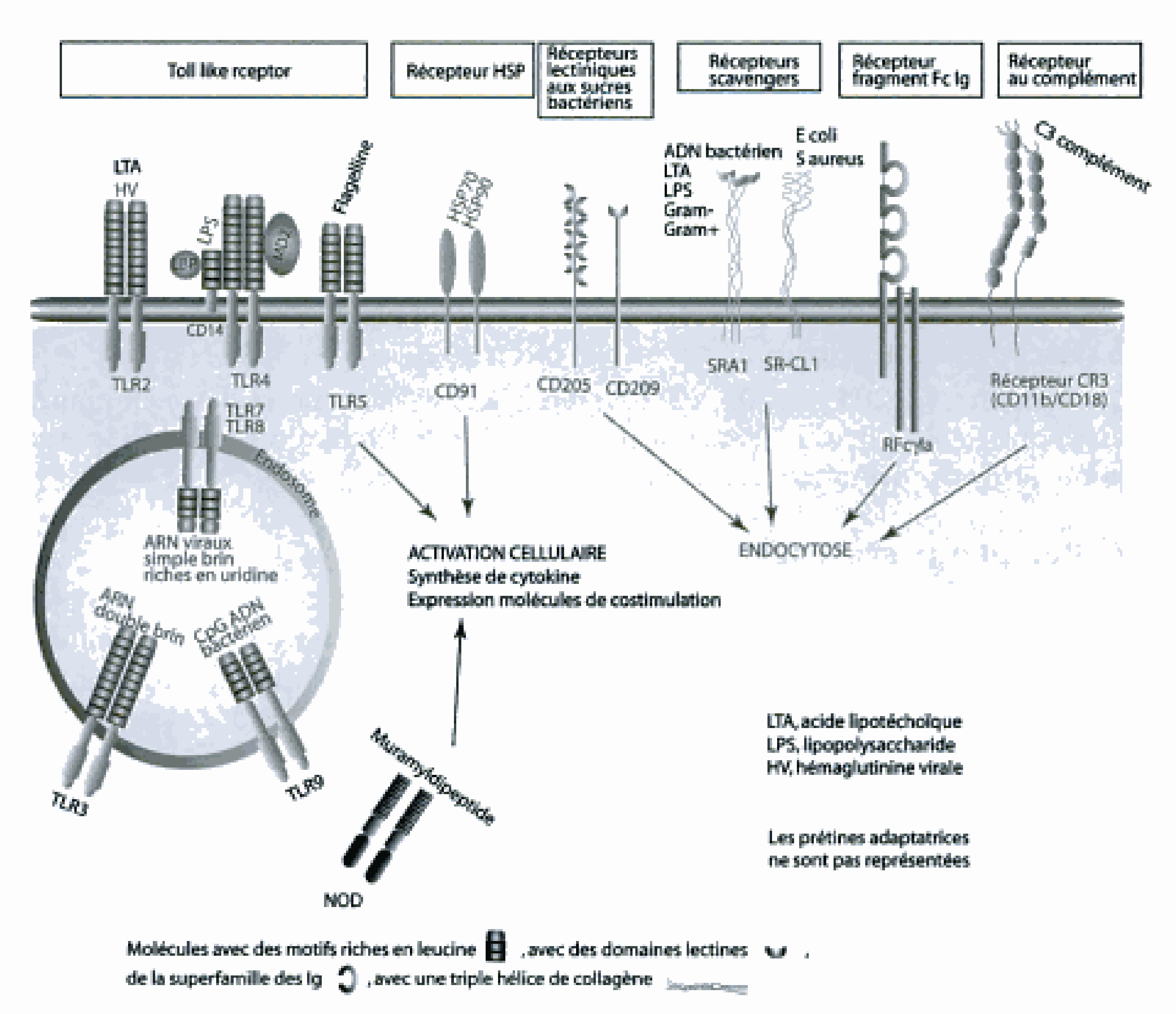


Figure 22. Principaux types de récepteurs de cellules dendritiques tissulaires

ce système, la détection des pathogènes extracellulaires est assurée par des récepteurs *Toll-like* et les pathogènes intracellulaires pour les récepteurs NBS-LRR.

- Famille des *Toll-like receptors* (TLR). Ils sont appelés ainsi par homologie avec une protéine de drosophile appelée Toll qui protège la mouche des infections. Les signaux générés par les TLR n'aboutissent pas à l'endocytose, mais au recrutement d'un facteur de transcription nucléaire NF-κB qui active la cellule dendritique avec synthèse de cytokines IL-1, IL-6, TNF-α et augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation.
- Ces récepteurs peuvent être à la surface des cellules, avec entre autres :
  - TLR 2, récepteur de certaines lipoprotéines bactériennes, de l'acide lipotéichoïque,
  - TLR4, récepteur au lipopolysaccharide (LPS), de la paroi des bacilles Gram–,
  - TLR5, récepteur à la flagelline, constituant des flagelles de bactéries Gram–.

  D'autres TLR se localisent dans les vacuoles d'endocytose et interagissent avec des molécules non exprimées à la surface des pathogènes mais résultant de leur dégradation :
  - TLR9, qui reconnaît les séquences d'ADN bactérien CpG non méthylées,
  - TLR3, qui reconnaît les ARN viraux double brin,
  - TLR7, 8 qui reconnaît les ARN viraux simple brin du HIV et du virus influenza.

- Famille des NLR (ou NACHT-LRR pour *domain present in neuronal apoptosis inhibitory protein* NAIP, CIITA, HET-E, TP1 – *leucin rich region*) qui comprend les protéines des familles NALP et NOD. Ils sont localisés dans le cytoplasme. Beaucoup de leurs ligands sont inconnus, mais les protéines NOD2 et NALP reconnaissent des muramyldipeptides provenant de la dégradation des peptidoglycanes de la paroi bactérienne. L'activation de NOD aboutit au recrutement du facteur de transcription nucléaire NF-κB.

b) Récepteurs lectiniques au sucre bactérien

Ces récepteurs, CD205, CD206, CD209, reconnaissent des sucres des membranes bactériennes, en particulier le mannose. L'occupation de ces récepteurs déclenche l'endocytose et la dégradation du pathogène.

c) Récepteurs scavengers

Il s'agit d'une famille nombreuse de protéines membranaires liant de multiples ligands, dont des lipoprotéines de faible densité oxydées, mais aussi des cellules apoptotiques (CD36 au mécanisme d'action mal connu, récepteur des phosphatidylsérines transloquées sur la face externe des cellules en apoptose), des structures bactériennes. Leur sollicitation déclenche la phagocytose.

d) Récepteurs au fragment Fc des Ig

Il existe à la surface des cellules dendritiques des récepteurs de forte et faible affinité pour le fragment Fc des Ig, respectivement RfcγRI (CD64) et RFcγRIIa (CD32), ainsi que des récepteurs RFcεRII de faible affinité pour le fragment Fc de IgE (CD23). Sur le récepteur de haute affinité, les Ac peuvent se fixer directement, alors que ce sont les complexes immuns Ag-Ac qui se fixent sur ceux de faible affinité. La fixation de complexes immuns déclenche la phagocytose.

e) Récepteurs aux opsonines du complément, récepteur CR3 (CD11b/CD18)

Ils appartiennent à la famille des intégrines. La particule recouverte de ces fragments de dégradation du complément se fixe ainsi et est endocytée.

f) Récepteur aux HSP

Face à une nécrose cellulaire, les protéines relarguées dans le milieu extracellulaire pourraient se fixer de façon non spécifique à des molécules chaperonnes HSP (*heat shock protein*), HSP 70, Gp96 et calréticuline. L'ensemble HSP-peptide est internalisé dans la cellule dendritique *via* CD91, et le peptide antigénique est présenté par les molécules de classe I du CMH.
Les HSP relarguées de cellules lysées pourraient également activer les cellules dendritiques avec synthèse de cytokines (IL-1, IL-12, TNF) et accélérer leur maturation. Cette activation passe par l'interaction de CD91 (récepteur à l'α-macroglobuline) avec HSP70, HSP90 et gp96, de CD36 avec gp96, de CD40, CD14, TLR2 et TLR4 avec HSP70 et de ces trois derniers avec HSP60.
Les cellules dendritiques pourraient ainsi répondre directement à des signaux du danger que sont les HSP synthétisées par les cellules en état de stress.

g) Pinocytose, sans intervention de récepteur

Un autre mode de capture des pathogènes et qui ne fait pas intervenir de récepteur est la pinocytose. La membrane plasmique s'invagine en permanence sous forme de vésicules qui seront ensuite restituées à la surface cellulaire. Ce mécanisme dépend du cytosquelette. Une cellule peut ingérer la moitié de son volume en une heure, englobant toutes les particules (< 10 nm) qui se trouvent dans son environnement direct. Cette boisson cellulaire permet à la cellule d'internaliser de grande quantité d'Ag, indépendamment de leur fixation à des récepteurs spécifiques.

B. Cellules dendritiques folliculaires

Elles sont mal connues. Leur lignage est incertain. Elles se localisent dans les centres germinatifs des follicules lymphoïdes. Elles capturent l'Ag entre autres par des récepteurs aux fragments Fc des Ig et aux opsonines du complément C3b et C3d, récepteurs CR1 (CD35), CR2 (CD21) et CR3 (CD11b/CD18). L'Ag est ainsi présenté sous forme native aux cellules B en division afin de tester l'efficacité des hypermutations somatiques dans les gènes encodant le BcR. Elles expriment aussi CD40L.

VI. Macrophages

A. Origine

Ils dérivent des monocytes sanguins. Les monocytes circulent dans le sang et ont une durée de vie courte. Ils prennent le nom de macrophages dans les tissus. Selon les tissus, les macrophages acquièrent des noms différents, macrophage alvéolaire (poumon), cellules de Kupffer (foie), ostéoclaste (os), chondroclaste (cartilage), microglie (tissu nerveux), histiocyte (tissu conjonctif), cellule mésangiale (glomérule).
Ils sont susceptibles de persister plusieurs mois et ne se multiplient plus.

B. Fonctions des macrophages

- Épuration de substances endogènes (facteurs de coagulation, Ig) de cellules sénescentes ou altérées, de cellules apoptotiques.
- Épuration de substances exogènes (poussières du poumon).
- Régulation de l'hématopoïèse.
- Détection du foyer inflammatoire.
- Rôles immunitaires :
  - première barrière de défense de l'immunité naturelle grâce aux récepteurs d'endocytose reconnaissant des structures communes à de nombreuses bactéries. Ils signalent le danger par la synthèse de cytokines ;
  - déclenchement de l'immunité spécifique, présentation antigénique sur les molécules HLA de classe I et II qu'ils expriment de façon constitutive, orientation des réponses vers la voie Th1 avec des lymphocytes auxiliaires synthétisant entre autres de l'INF-γ, activateur majeur des macrophages.

C. Mécanisme de l'endocytose

C'est l'invagination de la membrane cytoplasmique aboutissant à la formation d'une vésicule intracytoplasmique.
On distingue la pinocytose et la phagocytose :
- la pinocytose est la boisson cellulaire, invagination continue de la membrane plasmique englobant les particules solubles (< 10 nm) de l'environnement cellulaire. Un macrophage peut ingérer 25 % de son volume en une heure et la totalité de sa membrane plasmique en une demi-heure ;
- la phagocytose est le processus par lequel une substance est endocytée après fixation sur un récepteur.

D. Récepteurs

1. Récepteurs d'endocytose

Ils appartiennent aux mêmes familles que celles évoquées avec les cellules dendritiques :
- récepteur au mannose ;
- récepteur scavenger ;
- récepteurs des cellules apoptotiques par CD36, récepteur des phosphatidylcholines transloquées sur la face externe de la membrane plasmique des cellules en apoptose ;
- récepteur de haute et faible affinité au fragment Fc des IgG (CD64, CD16, CD32), au fragment Fc des IgA (CD89) et au fragment Fc des IgE de faible et forte affinité (respectivement RFcεII (CD23) et RFcεI) ;
- récepteur aux opsonines du complément dérivées de la fraction C3, récepteur CR1 (CD35), CR4 (CD11c/CD18), CR3 (CD11b/CD18), dérivé de la fraction C5, récepteur CD88 et récepteur à la fraction C1q du complément ;
- récepteur CD91 aux HSP, internalisation de molécules chaperonnes liées de façon non spécifique à des peptides.

2. Récepteurs d'activation cellulaire

Ce sont entre autres les récepteurs aux HSP (effet direct des HSP) et les récepteurs *Toll-like*. Le macrophage exprime plusieurs membres de la famille Toll dont TLR2, 4, 5, 6 et 9 :
- TLR2 s'associe à TLR6 de même qu'au CD14 pour reconnaître divers ligands bactériens tels des lipoprotéines, le peptidoglycane, l'ancre GPI du parasite *Trypanosoma cruzi*, certains LPS ;
- Le TLR4, lui, s'associe également au CD14 et lie le LPS, le taxol, la protéine de choc thermique 60 (HSP60) et la fibronectine EDA ;
- Le TLR 5 se lie à la flagelline bactérienne et le TLR9 reconnaît les motifs CpG de l'ADN ;
- Les TLRs sont impliqués dans la réponse inflammatoire et cytotoxique du macrophage en provoquant l'induction du TNFα, du NO et de l'IL-12 ;
- Le récepteur CD14 au lipopolysaccharide (LPS) bactérien, présenté par la *lipopolysaccharide binding protein* (LBP), possède un site de fixation à un groupement

GPI (phosphosylphosphatidylinositol) favorisant son ancrage à la membrane cellulaire, mais sans la traverser, interdisant tout contact avec le milieu cytoplasmique et donc toute interaction moléculaire permettant la transduction du signal en aval.

La fixation du complexe LPS/LBP au complexe CD14/TLR4 engendre un message intracellulaire qui va induire l'activité pro-inflammatoire du macrophage. Une molécule CD14, accrochée dans la membrane par une queue phosphatidylinositol, intervient dans un complexe avec TLR2 pour la fixation du LPS.

E. Mécanisme de la bactéricidie

L'interaction des récepteurs avec leur ligand met en route la production de médiateurs et l'activation du cytosquelette. Des pseudopodes englobent la particule. Ces pseudopodes fusionnent et forment une vésicule de phagocytose. Cette vésicule ou phagosome migre dans le cytoplasme et fusionne avec un lysosome pour former un phagolysosome. L'actine est dépolymérisée et le trafic sous la dépendance de microtubules. Des petites protéines liant le GTP et des annexines interviennent dans la régulation de ce trafic et la fusion.

Plusieurs voies concourent à la destruction du pathogène (bactéricidie) :

- enzymes hydrolytiques contenues dans les lysosomes ;
- mécanismes lytiques dépendant de l'oxygène (explosion, *burst* oxydatif) avec formation de radicaux oxygénés. Cette explosion oxydative est maximale après activation du macrophage par l'INF-γ des lymphocytes T et NK. Il existe deux voies pour la formation des radicaux oxygénés :
  - la NADPH oxydase qui aboutit à la production d'H_2O_2 et d'un singulet d'oxygène ou d'un radical hydroxyl capable de former avec des composés organiques des radicaux alkoxy RO* et peroxy RCOO* très actifs,
  - la myéloperoxydase, avec formation en présence d'H_2O_2 et d'halogénures de dérivés toxiques comme l'acide hypochloreux, les chloramines ;
- mécanismes indépendants de l'oxygène qui utilisent la voie de la NO synthase, avec production de monoxyde d'azote NO et de dérivés oxydés comme le peroxyde d'azote NO_2 ou des radicaux nitrosonium NO*, toxiques pour les bactéries. Cette voie est volontiers utilisée par les macrophages activés par l'INF-γ.

VII. Polynucléaires neutrophiles

Ils jouent un rôle fondamental dans les réactions inflammatoires aiguës et dans la défense contre les micro-organismes à développement extracellulaire par leur capacité phagocytaire et les substances sécrétées. On retrouve à leur surface les grandes familles de récepteurs au fragment Fc des Ig et aux fractions C3 (opsonines) et C5a (effet chimiotactique) du complément. Certains récepteurs *Toll-like* sont présents. Ils expriment une molécule CD66, de la super famille des Ig, capable de lier les bactéries du genre Neisseria. Ils n'utilisent pas la voie de la NO synthase mais celles des radicaux oxygénés sans stimulation par des cytokines extérieures. Ils interviennent dans le recrutement des cellules de l'immunité acquise.

VIII. Polynucléaires éosinophiles

La plupart se localisent dans les tissus après un bref passage dans le torrent circulatoire. Ils possèdent des récepteurs aux fractions du complément C3, C3a et C5a, ainsi que des récepteurs au fragment Fc des IgA, des récepteurs de faible affinité pour les fragments Fc des IgG et IgE ainsi que des récepteurs de forte affinité pour les fragments Fc des IgG, et surtout des IgE.
Leurs fonctions sont :

- d'endommager les larves de certains helminthes par le biais des IgE et du complément recouvrant les larves ;
- d'inactiver les médiateurs des basophiles-mastocytes, modulant les réactions induites par la dégranulation de ces cellules dans l'hypersensibilité immédiate.

IX. Polynucléaires basophiles

Leur forme tissulaire prend le nom de mastocyte. En surface, on trouve des récepteurs aux fractions C3, C3a et C5a du complément ainsi que des récepteurs de faible affinité pour le fragment Fc des IgG (RFcγRII) et de *forte affinité* pour le fragment Fc des IgE (RFcεRI).
Leur implication est fondamentale dans l'hypersensibilité immédiate, par la libération d'histamine induite par la fixation d'IgE sur leur récepteur Fc.
Ces cellules synthétisent également de l'IL-4 qui oriente vers une réponse Th2 ; elles interviennent aussi dans la défense contre les helminthes.

X. Plaquettes

À côté de leur rôle fondamental dans l'hémostase, les plaquettes sont impliquées dans la réaction inflammatoire et les défenses antiparasitaires par leurs récepteurs RFcεRI et RFcεRII. Elles possèdent également des récepteurs RFcγRII ainsi qu'à certaines fractions du complément.

XI. Globules rouges

Leur membrane possède des récepteurs CR1 au complément permettant la fixation des complexes immuns recouverts de molécules C3b et leur transport du sang vers les cellules de Kuppfer du foie qui les catabolisent.

L'essentiel de la question

Les différents types de cellules du système immunitaire :

Nature	Fonction
Lymphocytes	Reconnaissance spécifique du non-soi Lymphocyte T, médiateur de l'immunité cellulaire Lymphocyte B, médiateur de l'immunité humorale Reconnaissance de l'absence de soi ou du soi altéré Lymphocyte NK, cellule de l'immunité naturelle, élimination de cellules transformées
Cellules présentatrices d'Ag	Capture des Ag pour la présentation aux lymphocytes Cellule dendritique tissulaire, initiation des réponses spécifiques lymphocytaires T après apprêtement des Ag Macrophage, première barrière de défense de l'immunité naturelle, initiation de la réponse spécifique Cellule dendritique folliculaire, présentation de l'Ag natif au lymphocyte B, sélection de clone avec un récepteur B de haute affinité
Cellules effectrices	Élimination des Ag Lymphocyte T cytotoxique Macrophage, polynucléaire, plaquette

Marqueurs cellulaires utilisés en pratique courante :

Lymphocytes B	CD19, CD20, CD79, CD22
Plasmocytes	CD38, CD138
Lymphocytes T	CD3, CD4, CD8, CD7, CD2, CD5, TcR
Lymphocytes NK	CD16, CD56
Macrophages	CD11, CD16, CD32, CD64, CD14, CD68
Polynucléaires	CD15, CD16, CD24, CD65

Les différents types de lymphocytes :

	Reconnaissance de l'Ag	Fonctions effectrices
Lymphocyte B	Ag natif	Différenciation en plasmocyte, synthèse d'Ac
Lymphocyte T auxiliaire	Ag dégradé et présenté sur une molécule du CMH d'une CPAg	Synthèse de cytokines Th1, aide à l'activation des macrophages, rôle dans l'inflammation, les hypersensibilités retardées Th2, développement de l'immunité humorale en particulier à IgE Th17, activation des polynucléaires neutrophiles TFH, coopération B dans les centres germinatifs T régulateurs : T reg, Th3, Tr1, lymphocytes NKT, également Tγδ
Lymphocyte T cytotoxique	Cellule infectée exprimant un Ag de micro-organisme dans ses molécules HLA	Destruction de la cellule infectée
Lymphocyte NK	Reconnaissance du non-soi (absence d'expression d'un allèle HLA I) ou du soi altéré (expression MICA/B) sur les cellules transformées ou infectées par des virus	Destruction de la cellule transformée ou infectée

Type de récepteur	Phénotype	Reconnaissance
Lymphocyte T $\alpha\beta$	CD3+ CD4+CD8- ou CD4-CD8+	Peptide dans une molécule HLA Glycolipide sur une molécule CD1
Lymphocyte T $\gamma\delta$	CD3+ CD4-CD8 ou CD4-CD8+ faible	Répertoire limité, pas toujours restreint par le CMH Fonction cytotoxique, 1re ligne de défense Certains sont régulateurs

Les grandes étapes de la vie d'un lymphocyte :

	Stades		
	Cellules naïves	Différenciation	
		Cellules effectrices	Cellules mémoires
Lymphocyte B	Reconnaissance de l'Ag natif	Plasmocyte, synthèse d'Ac	+
Lymphocyte T auxiliaire	Reconnaissance de l'Ag à travers un peptide de dégradation exposé sur une molécule du CMH d'une CPAg	Th1, Th2, Th17, TFH, sécrétion de cytokines T régulateur (Th3, Tr1, T reg)	+
Lymphocyte T cytotoxique	Idem	Cytolyse	+
Récepteur à l'Ag	Oui	Lympho B Peu Lympho T Oui	Oui
Durée de vie	Plusieurs mois (années)	Brève (quelques jours)	Longue (années)
Lymphocyte B Affinité des Ig Isotype	 Faible IgM, IgD de membrane	 Variable IgM, IgG, IgA et IgE associées à la membrane et sécrétées	 Élevée Divers
Lymphocyte T Migration	 Vers les ganglions lymphatiques et les organes secondaires	 Vers les tissus périphériques	 Vers les ganglions et les tissus périphériques

Pour en savoir plus

- Janeway C.-A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. *Immunobiology*. Churchill Livingstone, Edimburg, 2001.
- Revillard J.-P. *Immunologie*. De boeck université, Bruxelles, 1999.
- Abbas A.-K., Lichtman A.-H. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Elsevier, 2005.
- Bensa J.-C. http://perso.orange.fr/dms.efsra/(Établissement français du sang).

Organes de l'immunité

E. BALLOT, S. HUGUET, C. JOHANET
Laboratoire d'immunologie et d'hématologie biologiques,
hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris.

Les points d'entrée potentiels des microorganismes sont multiples. Pour être efficace, le système immunitaire doit pouvoir répondre immédiatement à toute intrusion. Il n'existe donc pas un organe de l'immunité, mais de multiples structures diffuses permettant finalement la présence du tissu immunitaire dans de nombreuses formations anatomiques.
Pour bien comprendre certains paragraphes, en particulier le rôle du thymus, il est indispensable de connaître les marqueurs des lymphocytes T, envisagés dans la question consacrée aux cellules du système immunitaire. Enfin, la connaissance du système immunitaire associé aux muqueuses renvoie à la structure et aux fonctions des IgA.

I. Généralités

Le système immunitaire est composé d'un grand nombre de structures diverses qui représentent chez l'homme 1/60 du poids du corps. Ces structures sont disséminées dans l'ensemble de l'organisme. Elles sont formées de tissus lymphoïdes (tissus conjonctifs avec des lymphocytes et des phagocytes mononucléés).
Trois organes interviennent successivement (*fig. 1*) :
- les organes souches précurseurs des populations lymphocytaires ;
- les organes primaires : maturation, différenciation des différentes familles de lymphocytes ;
- les organes secondaires : siège des réactions immunitaires.

II. Organe souche, la moelle osseuse

Tous les précurseurs des cellules hématopoïétiques prennent naissance dans la moelle osseuse (MO) à partir d'une cellule souche unique totipotente : lignées érythrocytaires, mégacaryocytaires, granuleuses, monocytaires-macrophagiques, lymphocytaires.
La MO est formée d'un tissu conjonctif de soutien avec des cellules stromales, ensemble de fibroblastes, adipocytes, macrophages, cellules endothéliales, myoblastes, baignant dans une matrice extra-cellulaire avec diverses fibres (collagène, lamine). Les cellules souches hématopoïétiques se logent dans ce micro-environnement. C'est au contact des cellules stromales et dans un bain de cytokines que se fait la différenciation des cellules souches hématopoïétiques.
Les précurseurs des cellules B restent dans la MO chez l'homme pour achever leur différenciation (*fig. 1*).
Les précurseurs des lymphocytes T (prothymocytes) quittent la MO par le sang pour se diriger vers le thymus.
Ces précurseurs lymphocytaires représentent 20 % des cellules médullaires.
Une injection de MO permet de restaurer le système immunitaire chez la souris irradiée à dose létale.

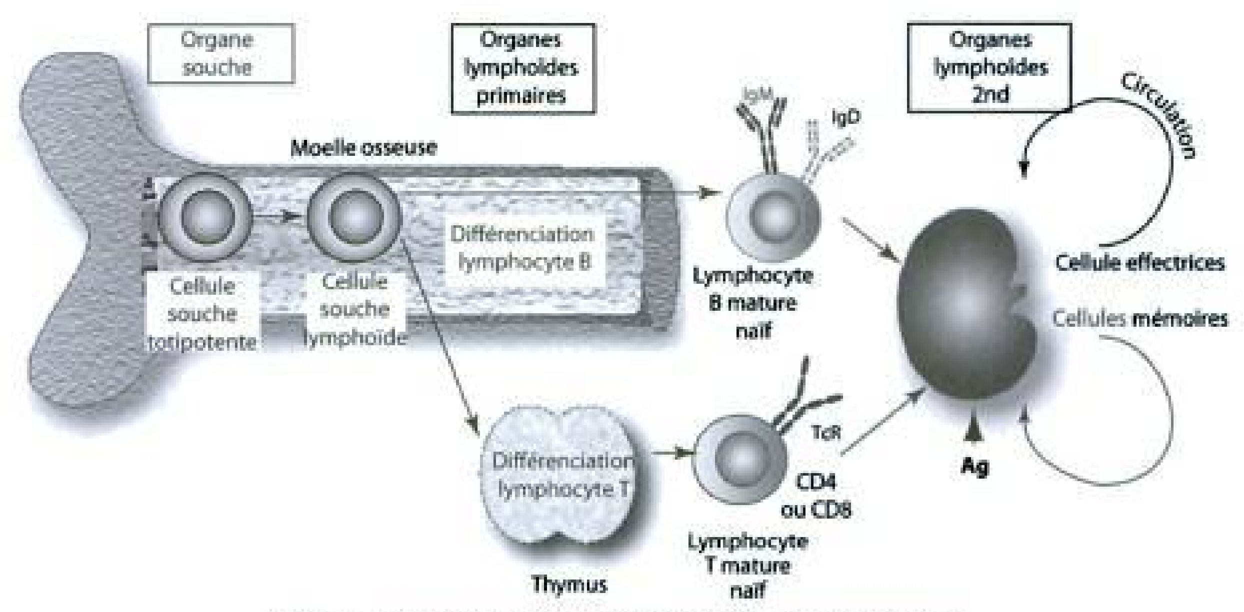


Figure 1. Organes lymphoïdes primaires et secondaires

III. Organes lymphoïdes centraux ou primaires

Ils permettent la multiplication et la différenciation des lymphocytes à partir des cellules souches lymphoïdes. Les lymphocytes y acquièrent leur répertoire de reconnaissance pour l'antigène par recombinaisons de gènes qui codent pour un récepteur spécifique à l'antigène (Ag). Ils y apprennent aussi à distinguer les Ag du non-soi des Ag du soi (qui seront tolérés) avec élimination des clones autoréactifs.

A. Moelle osseuse

- C'est l'organe où se différencient les cellules souches lymphoïdes en lymphocytes B matures chez l'homme. Arrivés à maturation après acquisition de leur récepteur de membrane spécifique d'un Ag, les lymphocytes B quittent la moelle osseuse par les capillaires sinusoïdes pour se diriger vers les organes lymphoïdes secondaires ;
- C'est aussi le lieu de synthèse des anticorps par les plasmocytes, stade ultime de la différenciation des cellules B dans les organes périphériques, qui rejoignent la MO ;
- C'est enfin un lieu important dans la différenciation des cellules NK.

La production médullaire de la moelle osseuse est continue toute la vie.

B. Thymus

1. Anatomie et embryologie

Organe bilobé avec un isthme central, le thymus se localise dans le médiastin antérieur et supérieur. Il est d'origine endodermique. Ses lobes proviennent de 2 ébauches latérales ayant migré en avant de chaque côté du cou, à partir des troisième et quatrième poches pharyngées. Sa structure définitive est acquise chez l'homme dès la vingt-troisième semaine.

2. Histologie

C'est un organe lympho-épithélial avec intrication de cellules épithéliales (d'origine endodermique) et de cellules lymphoïdes (d'origine mésenchymateuse). Il est constitué de deux lobes, chacun découpé en lobules séparés par des travées de tissu conjonctif. Chaque lobule comprend une zone corticale externe et une zone médullaire centrale.

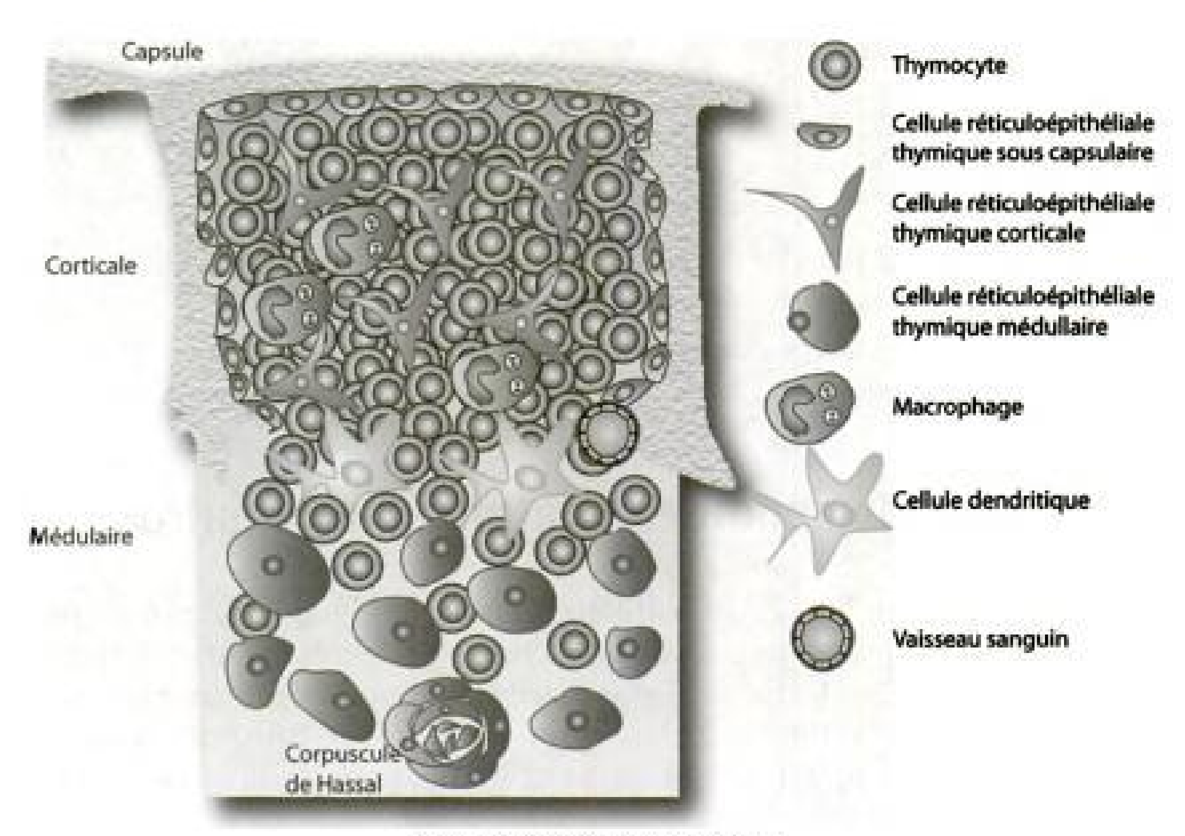


Figure 2. Structure du thymus

- Dans la *corticale*, divisée en cortex superficiel et profond, se trouvent de nombreux lymphocytes (thymocytes), des cellules épithéliales (CRET : cellules réticulo-épithéliales thymiques) riches en Ag du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), des macrophages. Il y a peu de cellules dendritiques ;
- Dans la *médullaire*, les thymocytes sont moins nombreux, au contraire des cellules épithéliales et des cellules dendritiques très abondantes. Les cellules épithéliales en voie de dégénérescence se chargent de kératine et s'arrangent en bulbes d'oignons caractéristiques (corpuscules de Hassal) dans la partie profonde de la médullaire.

Les CRET sous-capsulaires forment une barrière étanche autour des travées conjonctives où passent les vaisseaux, cloisonnant ainsi les lobules.

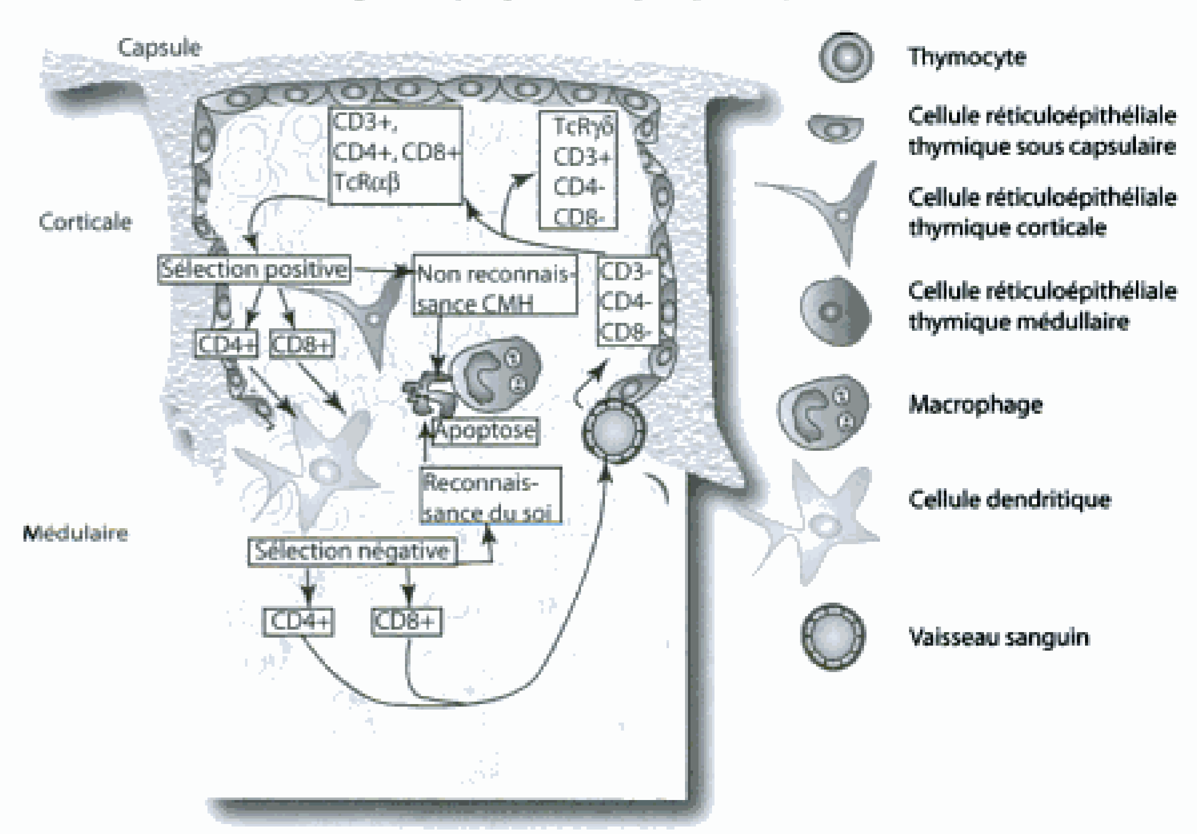
La vascularisation se fait à partir d'artères qui pénètrent les parois conjonctives et se divisent. Nombreuses artérioles et veinules à la jonction corticomédullaire.

Pas de vaisseaux lymphatiques afférents, seulement des lymphatiques efférents.

3. Physiologie du thymus

Chez l'animal thymectomisé à la fin de la gestation, on observe une lymphopénie, une absence d'immunité cellulaire, une dépression des réactions vis-à-vis des Ag thymo-dépendants ainsi qu'une tolérance de greffes allogéniques incompatibles.

Le thymus sert à la différenciation, à la multiplication et à la sélection des lymphocytes T. Les clones autoréactifs y sont délétés.
Les cellules précurseurs des lymphocytes T et issues de la MO entrent par voie sanguine à la jonction corticomédullaire et gagnent le cortex superficiel où elles se multiplient au contact des cellules épithéliales thymiques corticales (cellules nurses).
Dans le cortex profond se déroulent les étapes de la différenciation des thymocytes (*fig. 3*), avec réarrangement des gènes qui codent pour le récepteur spécifique à l'Ag des lymphocytes T ou TcR. Au contact des cellules épithéliales qui expriment abondamment les molécules de classe I et II du CMH, les thymocytes subissent le phénomène de sélection positive. Survivent les thymocytes qui ont réarrangé leurs gènes encodant pour le TcR de façon à pouvoir reconnaître les Ag du CMH autologue exprimés sur les cellules épithéliales de la trame thymique. La majorité (90 %) des thymocytes dont le TcR n'est pas complémentaire du CMH meurent par apoptose.
Dans ce cortex profond, et surtout dans la médullaire que les thymocytes gagnent, se déroule le phénomène de sélection négative. Sont éliminés ou inactivés des thymocytes dont le TcR reconnaît trop fortement des Ag du soi exprimés sur les cellules dendritiques, surtout, mais aussi des cellules épithéliales thymiques médullaires capables d'exprimer des Ag spécifiques d'autres tissus. Les différentes étapes de cette différenciation thymique des lymphocytes T sont détaillées dans la question consacrée aux cellules de l'immunité.
Leur différenciation achevée, les lymphocytes T matures mais naïfs, car ils n'ont pas encore rencontré l'Ag que leur TcR est potentiellement capable de reconnaître, quittent le thymus par les capillaires sanguins à la jonction corticomédullaire pour s'acheminer vers les organes lymphoïdes périphériques.



Les grandes étapes de la différenciation des lymphocytes T sont indiquées avec leurs marqueurs caractéristiques.

Figure 3. Phénomène de sélection positive et négative dans le thymus

Le développement du thymus est indépendant des stimulations antigéniques exogènes. Il involue progressivement à partir de la puberté, mais doit probablement rester fonctionnel toute la vie.
Les cellules épithéliales thymiques sont également capables de synthétiser des molécules mal connues (facteur thymique sérique).

IV. Organes lymphoïdes périphériques ou secondaires

Ils représentent l'environnement dans lequel les lymphocytes interagissent, entre eux et avec l'Ag, pour initier et amplifier la réponse. Ces interactions mettent en jeu les lymphocytes T et B matures, des cellules présentatrices d'Ag, à travers des contacts cellulaires et la synthèse de cytokines.
Les organes lymphoïdes périphériques comprennent :
- des organes encapsulés :
  - rate,
  - ganglions lymphatiques ;
- des formations lymphoïdes non encapsulées, distribuées à travers le corps, le plus souvent en association avec les muqueuses des tractus digestifs, respiratoires et urogénitaux.

Ils n'atteignent leur développement qu'après stimulation antigénique.

A. Ganglions lymphatiques

Il existe environ un millier de ganglions répartis dans tout l'organisme, de façon isolée ou groupée. Ils sont situés aux points de jonction des vaisseaux lymphatiques et forment un réseau qui draine et filtre la lymphe formée dans les espaces intercellulaires, apportant des Ag et des cellules présentatrices d'Ag. Les ganglions drainent des territoires bien définis.

1. Histologie

Ce sont des organes réniformes entourés d'une capsule conjonctive qui envoie des travées vers le hile, divisant le ganglion en lobules (*fig. 4*).
La lymphe arrive par des lymphatiques afférents sur la face externe des ganglions. Ils permettent le transfert des Ag libres ou apprêtés par les cellules présentatrices. Il n'y a jamais de lymphocytes T ou B dans la lymphe afférente. Après s'être déversée dans des sinus, la lymphe quitte le ganglion par des lymphatiques efférents au niveau du hile.
La vascularisation sanguine est assurée par une artère qui arrive au niveau du hile. Elle se divise en artérioles qui gagnent la corticale, artérioles qui se ramifient en capillaires au contact des follicules lymphoïdes. Dans les veinules postcapillaires qui leur font suite dans le cortex interfolliculaire et profond, les lymphocytes quittent la circulation sanguine, et passent dans le parenchyme du ganglion. Une veine collectant les ramifications des veinules postcapillaires sort du hile ganglionnaire.
Le tissu ganglionnaire est constitué de fibres de réticuline, de lymphocytes, de plasmocytes, de macrophages et de cellules dendritiques.

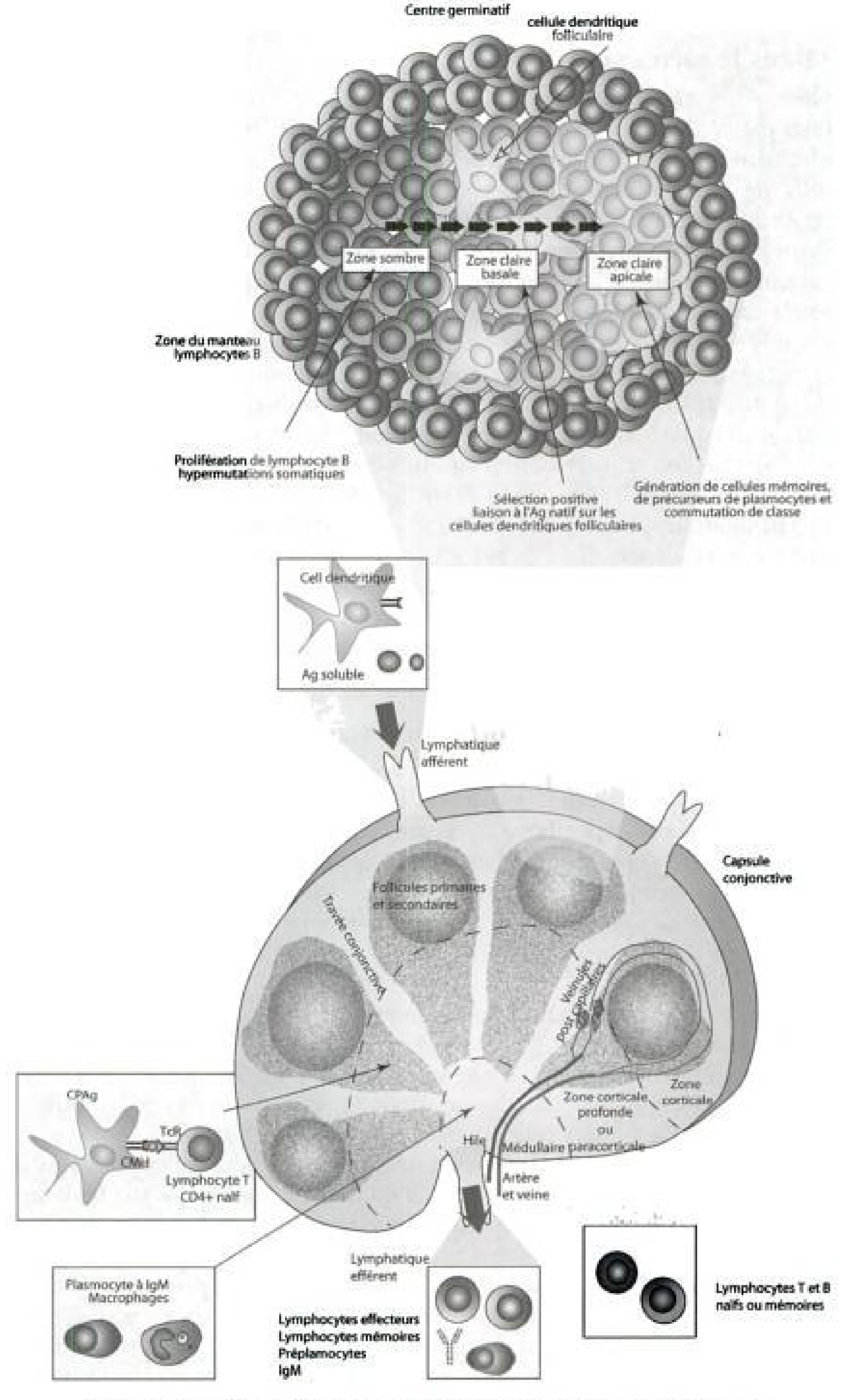


Figure 4. Structure d'un ganglion lymphatique et d'un follicule secondaire

2. Physiologie

a) Dans le cortex superficiel

On observe une nappe dense de lymphocytes organisés en follicules primaires (non stimulés par l'Ag). Ces follicules sont des amas arrondis de cellules surtout B. Ils se transforment en follicules secondaires après stimulation, contenant les centres germinatifs (*fig. 4*). Le follicule est une zone thymo-indépendante. C'est le lieu d'activation et de différenciation des lymphocytes B. Après stimulation antigénique, les lymphocytes B se transforment en centroblastes, grosses cellules hyperbasophiles qui repoussent en périphérie les lymphocytes non impliqués dans la réponse et qui vont former la zone du manteau. Ces centroblastes prolifèrent intensément, formant la zone sombre du follicule, avec des mutations somatiques très importantes dans les gènes encodant la structure de reconnaissance spécifique de l'Ag. Puis ils migrent vers le centre clair du follicule où ils prennent le nom de centrocytes. Ces centrocytes entrent en contact avec des cellules dendritiques folliculaires qui exposent à leur surface l'Ag sous forme native. Survient une sélection positive des centrocytes.
Seuls les lymphocytes B avec une Ig de surface de forte affinité pour l'Ag (résultant des hypermutations somatiques) reçoivent un signal de survie. Les autres meurent par apoptose. Les B sélectionnés par l'Ag pour leur forte affinité se différencient dans la zone claire apicale en B mémoires qui vont circuler à nouveau dans la lymphe et le sang pendant de nombreux mois, voire de nombreuses années, et des B activés qui migrent vers la MO ou le chorion des muqueuses où ils finissent de se transformer en plasmocytes.

b) Dans le paracortex, ou cortex profond

C'est là que sortent des veinules postcapillaires les lymphocytes mémoires ou naïfs. C'est également là qu'arrivent les cellules dendritiques des lymphatiques afférents. C'est une zone thymo-dépendante. C'est le site d'induction des réponses T et de la réponse primaire T dépendante. Elle est riche en lymphocytes T et cellules présentatrices (cellules dendritiques tissulaires, cellules de Langerhans de l'épiderme). On y trouve aussi des lymphocytes B en cours de migration vers les follicules.

c) Dans la médulla

C'est là que se collectent les sinus lymphatiques. On y rencontre des macrophages et des plasmocytes à IgM.
Les échanges cellulaires se font uniquement dans le sens sang-ganglions au niveau des veinules postcapillaires. La lymphe afférente ne contient pas de lymphocytes, mais apporte des Ag (et des cellules présentatrices ayant capturé l'Ag). Les lymphocytes circulants entrent dans le ganglion au niveau des veinules postcapillaires du paracortex. Les lymphocytes ne peuvent quitter le ganglion que par les lymphatiques efférents. La lymphe efférente diffuse le résultat de la réponse immunitaire à tout l'organisme.
Cette répartition anatomique des lymphocytes est sous la dépendance de chémokines pour lesquelles les lymphocytes expriment des récepteurs particuliers. Les lymphocytes B ont un récepteur spécifique au facteur chémo-attractif produit par les cellules dendritiques folliculaires, et les lymphocytes T un récepteur aux chémokines produites par l'endothélium des veinules postcapillaires du paracortex.

B. Rate

1. Histologie

Située dans la partie gauche de l'abdomen, la rate est un organe entouré d'une capsule fibreuse et divisée en lobules par des travées de tissu conjonctif. Deux types de tissus coexistent.

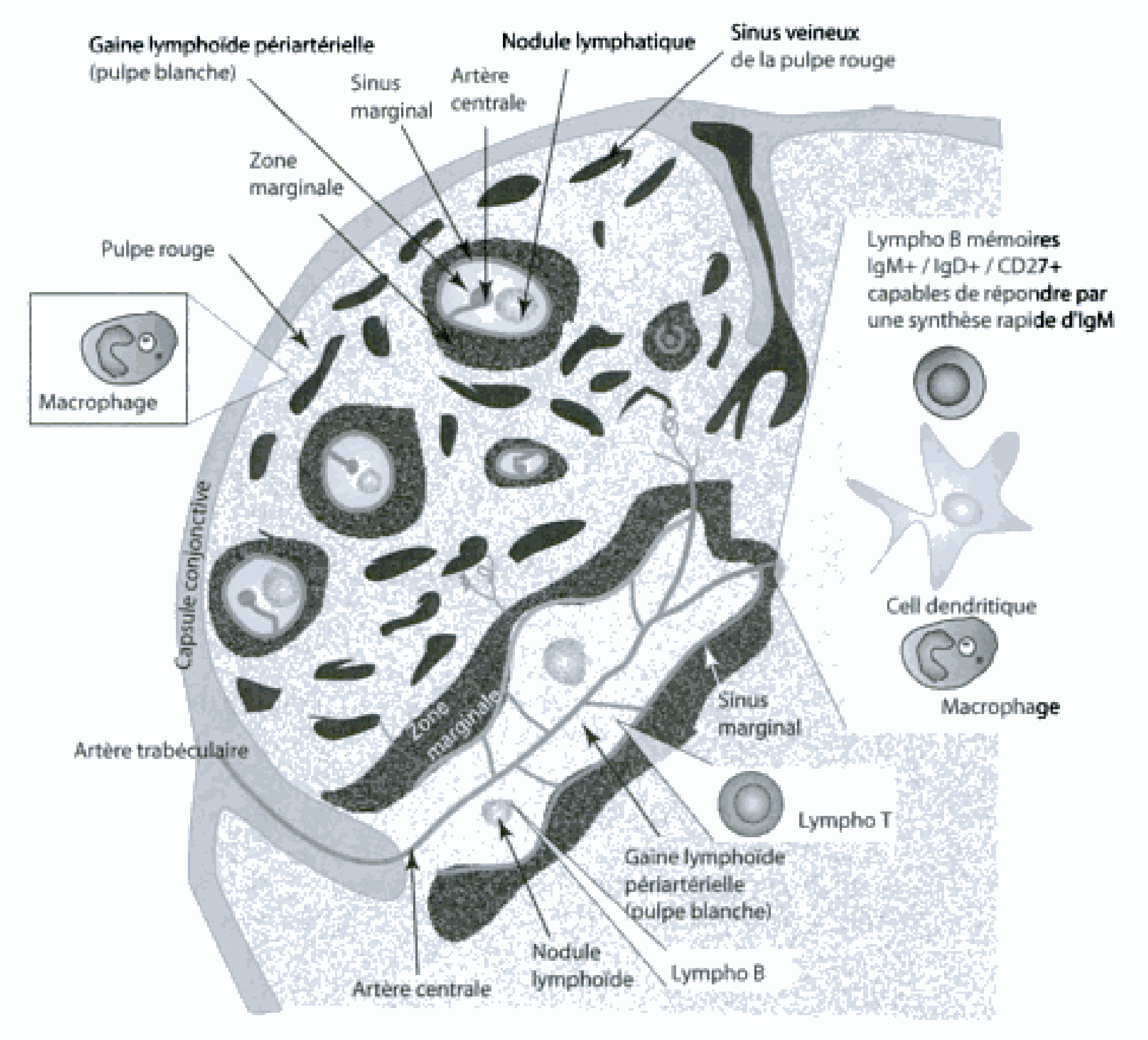


Figure 5. Structure de la rate

a) Pulpe rouge

Elle comporte de nombreux sinus veineux séparés par des cordons avec de nombreux macrophages et fibroblastes dans une matrice riche en réticuline. Les macrophages sont au contact étroit des sinus. Ils sont impliqués dans la destruction de cellules altérées véhiculées par le sang, sans déclenchement de réponse immunitaire (destruction des hématies sénescentes). C'est aussi un lieu de stockage des hématies.

b) Pulpe blanche

Elle correspond au tissu lymphoïde. C'est une gaine lymphoïde périartérielle. Les branches de l'artère splénique entrent par le hile, se divisent, passent dans les travées de tissu conjonctif, et en sortant de ces travées s'entourent d'un manchon de cellules lymphocytaires T, avec en périphérie des follicules lymphoïdes (lymphocytes B) primaires et secondaires, avec des cellules dendritiques et des macrophages. La zone thymo-dépendante se situe donc le plus près de l'artériole et la zone thymo-indépendante avec les follicules à la périphérie du manchon.

c) Zone frontière marginale

Elle se situe entre pulpe rouge et pulpe blanche. Les branches des artères spléniques centrant la pulpe blanche se résolvent en capillaires à la fin de la pulpe blanche. Certains capillaires se déversent dans les sinus veineux de la pulpe rouge et d'autres forment des sinus marginaux, à la frontière pulpe rouge/pulpe blanche, délimitant la zone marginale. Cette zone est très riche en macrophages capturant les pathogènes dans la circulation sanguine. Elle est également riche en cellules dendritiques et en lymphocytes B mémoires.
Il n'y a pas de lymphatiques efférents, seulement des lymphatiques afférents.

2. Physiologie

La rate est un filtre interposé sur les vaisseaux sanguins. Elle capte les Ag véhiculés par le sang ainsi que les cellules sénescentes.

C. Système immunitaire associé aux muqueuses (MALT)

1. Distribution et histologie

Les muqueuses des voies urogénitales, aériennes supérieures, du tube digestif, sont infiltrées de tissu lymphoïde non encapsulé.
Selon la localisation, on distingue :
- le système immunitaire du nasopharynx (NALT) avec l'anneau de Waldeyer et les végétations adénoïdes ;
- le système immunitaire du tube digestif (GALT) avec les plaques de Peyer, l'appendice, les lymphocytes intra et sous-épithéliaux. Il contient plus de cellules immunitaires que le reste de l'organisme ;
- le système immunitaire de l'arbre respiratoire (BALT), nombreuses formations lymphoïdes le long de l'arbre respiratoire ;
- le système immunitaire des voies urogénitales, en particulier au niveau du vagin.

Ce système comprend :
- des structures individualisées :
  - les plaques de Peyer, agrégat de follicules dans le chorion de la muqueuse de l'iléon terminal (partie terminale du grêle) formant un dôme bombant dans la lumière intestinale et dépourvu de villosités à cet endroit. L'épithélium à ce niveau comprend des entérocytes spécialisés, les cellules M capables de capturer les pathogènes de la lumière intestinale par endocytose et de les délivrer aux macrophages et aux cellules dendritiques à leur pôle basal (*fig.* 6),
  - l'appendice avec un abondant tissu lymphoïde sur toute la circonférence du chorion,

– l'anneau de Waldeyer avec les 2 amygdales palatines (*fig.* 7), les 2 amygdales tubaires, l'amygdale pharyngée et l'amygdale linguale. L'épithélium de surface s'invagine pour former des cryptes autour desquelles se rassemble le tissu lymphoïde ;

• du tissu lymphoïde diffus dans la *lamina propria* de toutes les muqueuses.

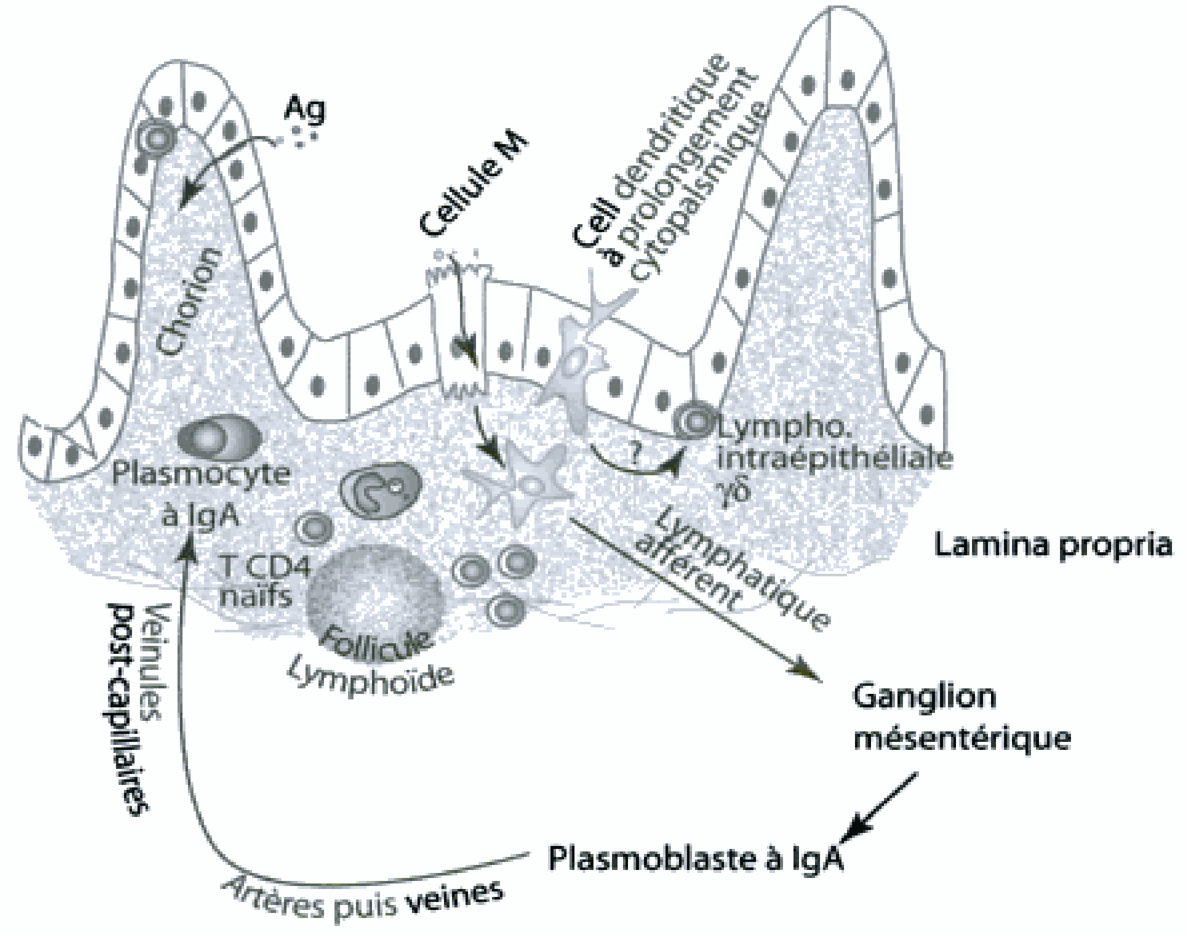


Figure 6. Organisation structurale d'une plaque de Pleyer

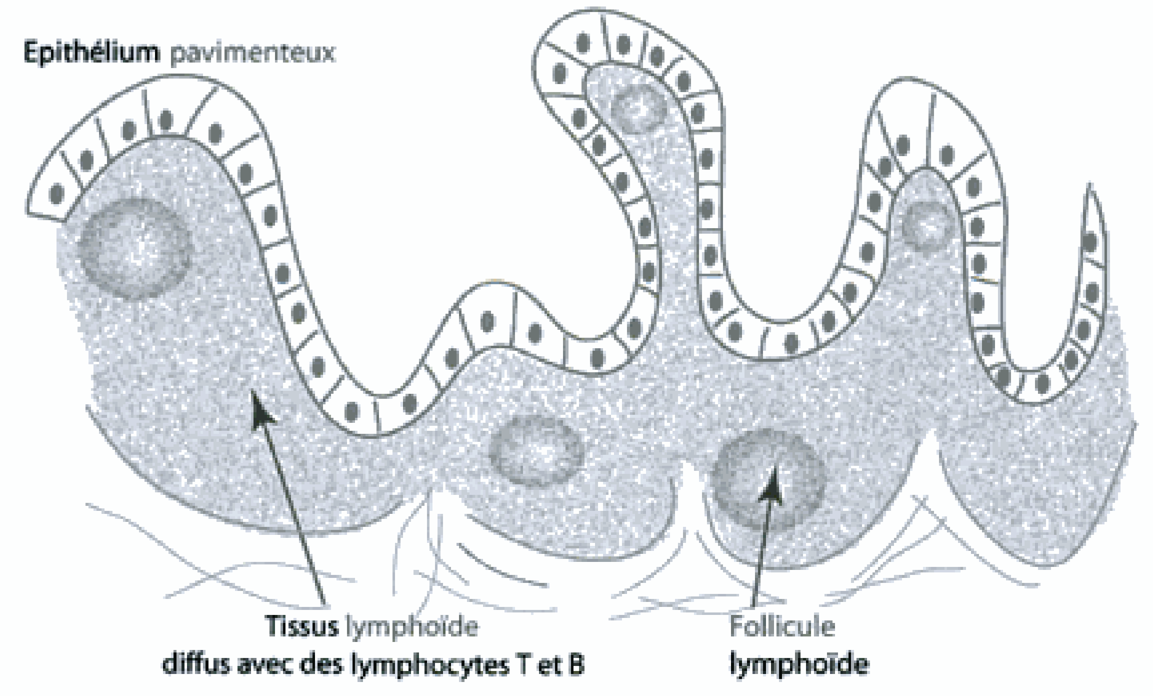


Figure 7. Organisation structurale d'une amygdale

2. Physiologie

Sont présents dans le système MALT les précurseurs des plasmocytes qui synthétisent les IgA sécrétoires. Les dimères d'IgA synthétisés par les plasmocytes se fixent à un récepteur (*poly Ig receptor*) au pôle antiluminal des cellules épithéliales. Ce récepteur assure la translocation du dimère d'IgA vers le pôle luminal de la cellule épithéliale. Après protéolyse partielle, la partie extra-cellulaire du récepteur (qui prend le nom de pièce sécrétoire) reste associée au dimère d'IgA, rendant l'Ig plus résistante à la dégradation.
Ces IgA assurent une protection contre les bactéries présentes dans la lumière de ces organes, empêchant la liaison à l'épithélium et la pénétration des pathogènes dans la muqueuse.
Un peu à part, les IgA sécrétoires du lait maternel. Pendant la période de lactation, les lymphocytes activés dans les formations lymphoïdes du tube digestif gagnent la glande mammaire avec synthèse d'IgA sécrétoires dans le lait maternel pour la protection passive du tube digestif du nouveau-né.

V. Circulation lymphocytaire

Les lymphocytes se déplacent entre les tissus et les organes lymphoïdes afin d'exercer leur rôle de surveillance, en empruntant les voies sanguines et lymphatiques (*fig. 8*). C'est la circulation des lymphocytes ou écotaxie, ou *homing*. Cette circulation est bien étudiée pour les lymphocytes T. Elle est régulée par l'expression de sélectines, de chémokines et d'intégrines qui vont se comporter comme un code postal reconnu par les molécules de domiciliation exprimées par les différentes sous-populations de lymphocytes. Il existe une véritable sélectivité de la domiciliation des lymphocytes, fonction des tissus et des besoins.

A. Mécanismes

Les leucocytes interagissent avec des molécules exprimées sur l'endothélium des veinules postcapillaires. Les veinules postcapillaires des ganglions et des plaques de Peyer permettent l'entrée permanente des lymphocytes. Dans la plupart des tissus, cette entrée ne sera possible qu'en cas d'inflammation.
Quatre étapes successives permettent la traversée de l'endothélium des veinules postcapillaires (*fig. 9*) :

- contact assuré par des sélectines entre la membrane du lymphocyte et celle de l'endothélium qui entraîne le roulement du lymphocyte sur la paroi vasculaire, car les leucocytes circulent à grande vitesse dans le sang. Cette étape est réversible. Les sélectines lient par leur domaine lectine des résidus sucrés. La sélectine L est présente de façon constitutive sur tous les lymphocytes T. Les sélectines E et P sont exprimées par les cellules endothéliales en regard d'un foyer inflammatoire ;

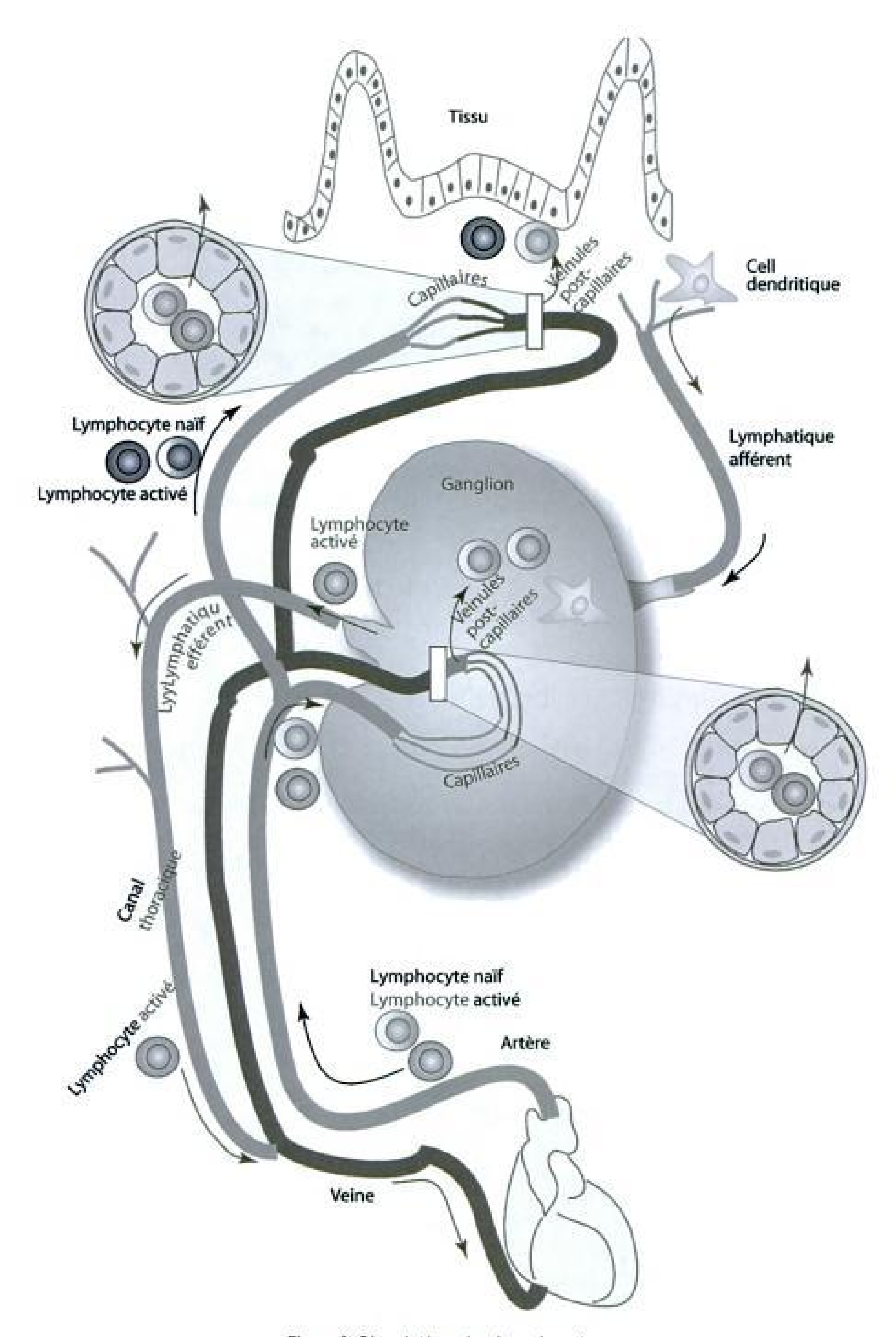


Figure 8. Circulation des lymphocytes

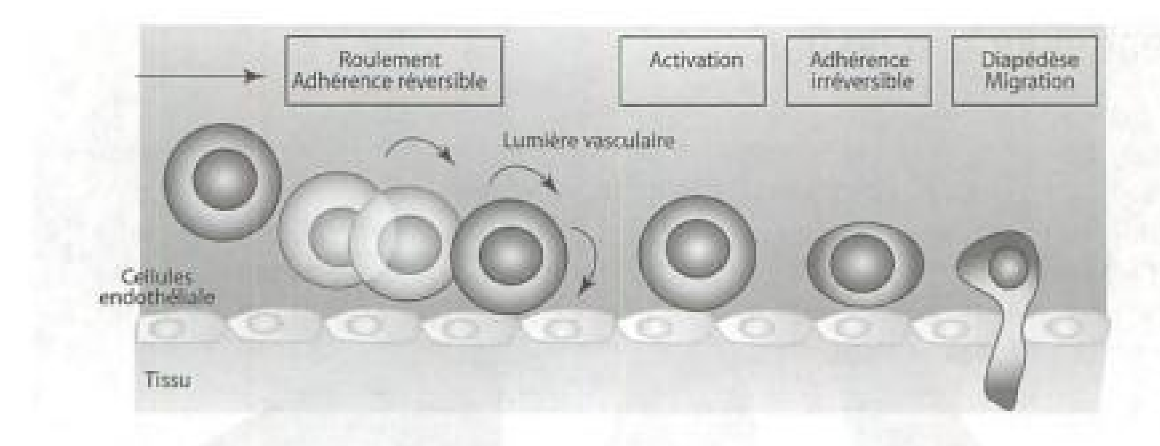
- activation des lymphocytes. Elle est induite par l'interaction des chimiokines adsorbées sur des glycosaminoglycanes des veinules postcapillaires et d'un récepteur exprimé sur les lymphocytes de façon constitutive ou induite. Les chémokines sont de petites molécules aux propriétés chémo-attractives régulant les migrations des leucocytes. Une quarantaine sont décrites. Elles sont dénommées CCL, CXCL, XCL, CX3CL selon leur extrémité NH_2. Certaines sont produites de façon constitutive, régulant le trafic lymphocytaire, d'autres sont exprimées en situation inflammatoire. Elles ont une grande affinité pour les molécules chargées négativement comme les protéoglycanes sulfatés. Leur adsorption permet une importante concentration locale. Leurs récepteurs sont dénommés CCR ou CXCR. Une vingtaine sont décrites, certaines constitutives, d'autres inductibles en situation inflammatoire pour attirer une population particulière. Ces récepteurs sont des protéines à 7 passages transmembranaires couplées à la protéine G. Le signal transmis par une protéine G déclenche l'activation du lymphocyte avec expression d'intégrines ;
- adhérence irréversible nécessitant l'interaction des intégrines lymphocytaires et des membres de la superfamille des Ig exprimés par l'endothélium. Les intégrines sont des hétérodimères non covalents qui doivent être activés pour exercer leur fonction d'adhésion. Plusieurs d'entre elles interviennent dans les migrations (LFA1 ou CD11a-CD18, Mac1 ou CD11b, VLA4 ou CD49-CD29) ;
- diapédèse, passage entre les cellules endothéliales des lymphocytes ainsi stabilisés.

B. Migration des lymphocytes naïfs

Les lymphocytes T naïfs expriment la sélectine L qui se lie à des polysaccharides complexes. Une chémokine (CCL21) fortement exprimée par les cellules endothéliales des veinules postcapillaires des ganglions et des plaques de Peyer assure le recrutement lymphocytaire.
Les lymphocytes expriment en effet de façon constitutive le récepteur CCR7 à cette chémokine, prélude à une interaction stable faisant intervenir des intégrines activées, puis la diapédèse. La répartition des lymphocytes entre les différentes zones ganglionnaires dépend également de gradients de chémokines. Les lymphocytes B utilisent CCR7 et d'autres récepteurs, sensibles à des chémokines produites par les cellules folliculaires. Les phénomènes sont moins bien connus au niveau des veinules de la rate, mais semblent similaires.

C. Migration des lymphocytes actifs

Après leur activation, les lymphocytes modifient l'expression des récepteurs des chémokines permettant le départ des lymphocytes effecteurs par les lymphatiques efférents. Cette activation a aussi pour effet l'acquisition par le lymphocyte de récepteurs à des chémokines produites par les cellules endothéliales en regard des foyers inflammatoires. Cette sécrétion endothéliale est sous le contrôle de cytokines produites par les phagocytes présents dans le foyer inflammatoire. Les lymphocytes T activés se mettent aussi à exprimer les ligands des sélectines E et P, ces deux sélectines étant exprimées par l'endothélium en périphérie du site d'infection.



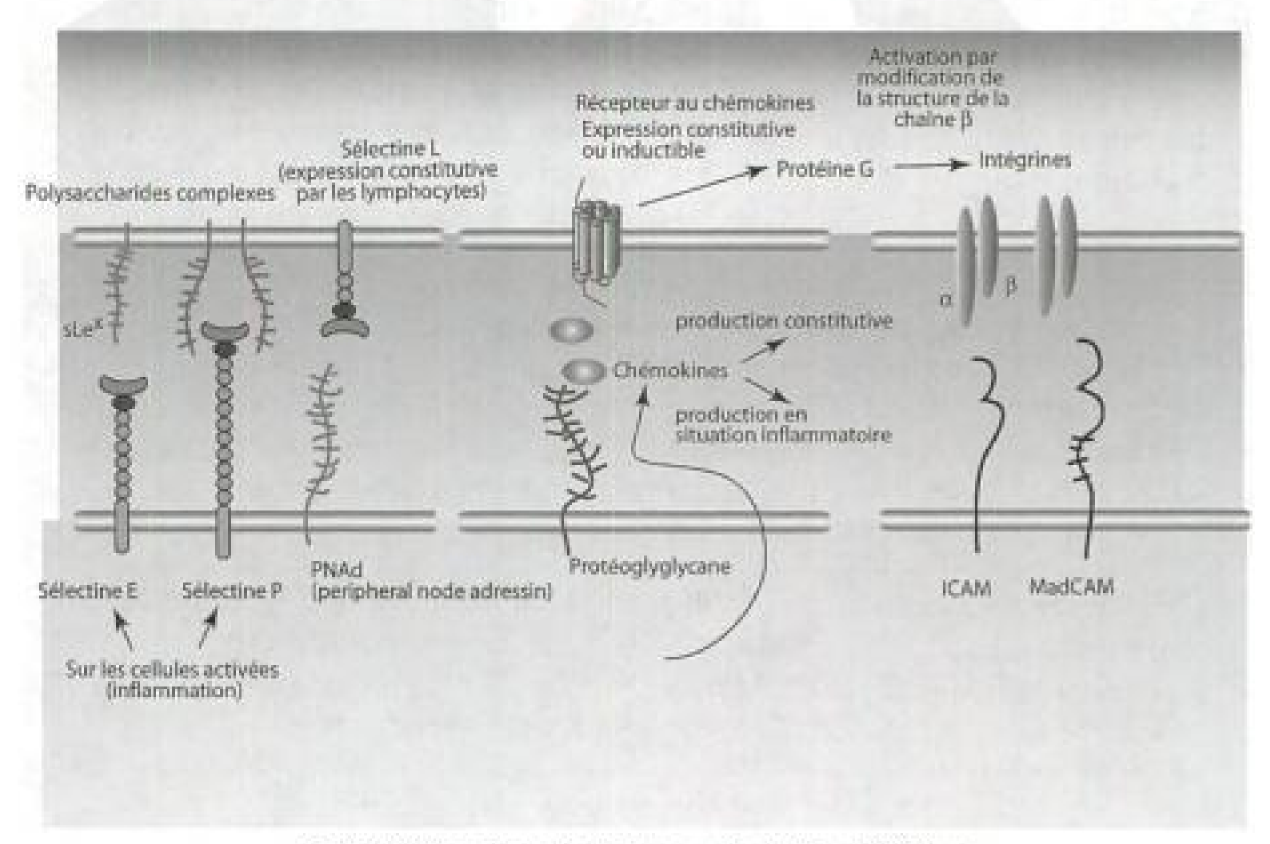


Figure 9. Mécanisme de la traversée de l'endothélium des veinules postcapillaires par les lymphocytes

Ils se mettent aussi à exprimer des récepteurs sensibles aux chémokines inflammatoires. Ainsi, par exemple, les lymphocytes T activés dans les ganglions mésentériques retournent dans les plaques de Peyer car ils ont acquis durant leur activation dans ces ganglions des intégrines a4b7 ligand de MadCam1 et de CCR se liant à CCL25, présent uniquement au niveau des plaques de Peyer.

En fonction des récepteurs exprimés, les lymphocytes T mémoires vont se retrouver dans les organes lymphoïdes secondaires comme les T naïfs (par l'intermédiaire de CCR7 comme les T naïfs), se diriger vers les tissus par les cytokines inflammatoires, ou patrouiller dans les tissus périphériques comme le derme, sous l'effet de certaines chémokines locales.

L'essentiel de la question

<table>
<tr><td colspan="6">Organes lymphoïdes primaires
Multiplication, différenciation des précurseurs des lymphocytes T et B en cellules aptes à coloniser les organes secondaires. Acquisition du répertoire, les lymphocytes réarrangent des gènes codant pour un récepteur spécifique à l'Ag. Délétion des clones autoréactifs.</td></tr>
<tr><td colspan="3">Moelle osseuse
Différenciation des prolymphocytes B en lymphocytes B matures mais naïfs car ils n'ont pas encore rencontré l'Ag. Délétion des clones reconnaissant les peptides du soi.</td><td colspan="3">Thymus
Différenciation des prothymocytes en lymphocytes T matures mais naïfs. Sélection positive et négative. Survivent les lymphocytes reconnaissant les molécules HLA du sujet, puis meurent ou sont inactivés les lymphocytes reconnaissant trop fortement les peptides du soi présentés par les molécules HLA.</td></tr>
<tr><td colspan="6">Organes lymphoïdes secondaires
Présentation de l'Ag, développement de la réaction immunitaire spécifique. Les lymphocytes T se différencient en T effecteurs qui migrent vers les sites d'infection. Les lymphocytes B effecteurs se différencient en plasmocytes sécréteurs d'Ac qui terminent leur maturation dans la moelle ou les formations lymphoïdes. Stockage de l'information par des lymphocytes mémoires, dissémination de l'information par la circulation des lymphocytes.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Ganglions lymphatiques
Concentrent les Ag drainés par les lymphatiques afférents</td><td colspan="2">Rate
Elle capte des Ag par voie sanguine</td><td colspan="2">Système immunitaire associé à la muqueuse
Rôle de défense locale et synthèse des IgA sécrétoires</td></tr>
<tr><td colspan="6">Circulation des lymphocytes ou écotaxie, ou homing
Les lymphocytes circulent en permanence entre les organes lymphoïdes ou se dirigent vers les sites d'infection de façon régulée. Cette régulation est assurée par l'expression sélective de molécules d'adhésion (récepteurs du homing) sur les lymphocytes, et de leurs ligands spécifiques appelés adressines variables selon les endotheliums. Elle dépend également de la synthèse spécifique selon les tissus de molécules chémo-attractives ou chémokines, et de l'expression lymphocytaire de leurs récepteurs fonction de l'activation lymphocytaire.</td></tr>
</table>

La moelle osseuse assure trois fonctions :
- maintien d'un contingent de cellules souches ;
- organe lymphoïde primaire pour les cellules B ;
- hébergement des B activés par l'Ag en provenance des organes secondaires et qui se transforment en plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

Pour en savoir plus

- Janeway C.-A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. *Immunobiology*. Churchill Livingstone, Edimburg, 2001.
- Revillard J.-P. *Immunologie*. De boeck université, Bruxelles, 1999.
- Abbas A.-K., Lichtman A.-H. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Elsevier, 2005.
- Bensa J.-C. http://perso.orange.fr/dms.efsra (Établissement français du sang).

Hypersensibilité : immédiate, retardée et par complexes immuns

C. JOHANET, E. BALLOT
Laboratoire d'immunologie et d'hématologie biologiques,
hôpital Saint-Antoine, Paris.

L'hypersensibilité est une réaction immunologique disproportionnée entraînant une maladie chez certains individus. L'allergie et les maladies auto-immunes sont des hypersensibilités.
Les réactions d'hypersensibilité correspondent à des réactions d'immunité spécifique dirigées contre des Ag localisés sur des cellules ou dans des tissus, à l'origine de lésions cellulaires ou de réactions inflammatoires. Ces réactions peuvent se développer dans le cadre de mécanismes de défense vis-à-vis d'un micro-organisme pathogène (la réaction inflammatoire permet par exemple d'éviter la dissémination d'une infection). Cependant, dans certains cas, ces réactions peuvent se développer vis-à-vis d'agents non pathogènes en eux-mêmes qu'on appelle allergènes. On parle alors de réactions allergiques.
Ces réactions allergiques sont une cause majeure de morbidité (maladie).
Elles sont induites par un premier contact avec l'allergène qui provoque la réponse immunitaire spécifique, humorale et cellulaire. L'individu est sensibilisé.
Elles sont déclenchées à l'occasion d'un deuxième contact avec le même allergène.
C'est à la faveur de facteurs génétiques (CMH classe II) et environnementaux que certaines personnes développent ces réactions d'hypersensibilité (HS).
Ces réponses sont identiques à la réponse à un pathogène, mais puisque la substance étrangère est inoffensive, la pathologie observée n'est due qu'à la réponse immune. La gamme des réponses allergiques s'étale du simple écoulement nasal et de l'éternuement qu'on observe dans le rhume des foins jusqu'à l'anaphylaxie systémique entraînant la mort, en réponse à une piqûre d'abeille chez des sujets particulièrement sensibilisés.

I. Classification

Les réactions allergiques ont d'abord été classées d'après leurs effets cliniques.
Il existe une classification des réactions d'hypersensibilité proposée par Gell et Coombs. Elle est basée sur les mécanismes effecteurs, c'est-à-dire en fonction des acteurs impliqués.
Elle différencie 5 types de réactions d'HS :

Classification de Gell et Coombs	
Type I :	HS immédiate ou allergie ou atopie ; implique des Ac de classe IgE. Les mastocytes et les basophiles libèrent des médiateurs de l'anaphylaxie.
Type II :	HS semi-retardée ou HS dépendante des AC. Correspond aux destructions cellulaires et lésions tissulaires par l'action des Ac (IgM, IgG). Lyse par le complément ou ADCC.
Type III :	HS semi-retardée ou à immuns complexes (IC). Dépôt d'IC circulants ou d'Ic formés *in situ*. Réaction inflammatoire avec infiltration par des polynucléaires qui produisent des lésions de nécrose.
Type IV :	HS retardée (HSR). Immunité cellulaire. Correspond aux réactions inflammatoires dues aux lymphocytes T.
Type V :	Implique des auto-Ac antirécepteurs. La fixation de l'Ac peut stimuler le récepteur comme l'hormone (agoniste), ou l'inhiber en bloquant l'accès de l'hormone (antagoniste).

Les HS de type I, II et III impliquant des Ac peuvent être transmises par les Ac du donneur à un receveur naïf. En revanche, les réactions de type IV impliquant des cellules, ces réactions ne peuvent être transmises que par les lymphocytes T d'un donneur sensibilisé.

II. Hypersensibilité de type I ou anaphylaxie ou atopie

A. Clinique

Cette HS se manifeste sous différentes formes.
Les pneumallergènes véhiculés par l'air induisent préférentiellement des manifestations respiratoires, les trophallergènes (Ag pénétrant par voie digestive), les allergènes cutanés et transcutanés, sont à l'origine des manifestations systémiques, respiratoires, digestives et cutanées.

1. Des formes générales : le choc anaphylactique

Le choc anaphylactique est l'*accident le plus grave et le plus brutal* qui puisse être déclenché par des Ag. C'est un choc vasoplégique (dilatation des vaisseaux).
Il débute, quelques secondes après l'injection ou l'ingestion de la substance déclenchante, par une sensation de malaise général. Très vite viennent ensuite les signes de collapsus (pâleur, pouls filant, rapide, sueurs froides, pression artérielle effondrée, impression de mort imminente). Des signes cutanés (placards urticariens ou urticaire géant) peuvent apparaître. L'obstruction respiratoire peut dominer la scène avec asphyxie. L'œdème de Quincke atteint la face et le cou puis la glotte, et conduit donc à une dyspnée laryngée, d'où cyanose et asphyxie.
Les principales circonstances de survenue sont les piqûres d'hyménoptères, l'injection de médicament, l'injection d'iode, les aliments, les traitements de désensibilisation.
Sans traitement, le choc anaphylactique conduit inéluctablement à la mort.

2. Les formes muqueuses

Les plus courantes sont :
- la conjonctivite allergique ;
- les rhinites allergiques (rhume des foins) ;
- l'asthme allergique.

Ces formes sont déclenchées par l'inhalation d'allergènes, pneumallergènes comme les pollens (d'arbres, de graminées, d'herbacées), les poils d'animaux ou les poussières (déjections d'acariens).

3. Les formes cutanées

- La dermatite atopique ou eczéma atopique : dermatose très fréquente du nourrisson avant le 3[e] mois qui se manifeste par des éruptions érythémateuses, prurigineuses, puis vésicules, suintement et desquamation. L'eczéma est souvent associé à une allergie alimentaire et une allergie respiratoire. C'est une maladie héréditaire dominante ;
- L'urticaire : éruption caractéristique faite de papules ortiées (qui ressemblent aux papules après piqûre par de l'ortie), fugaces, prurigineuses.

4. L'allergie alimentaire

Se manifeste sous forme :
- extra-digestive (urticaire, œdème de Quincke…) ;
- digestive (diarrhée, vomissement).

L'allergie alimentaire est déclenchée par des trophallergènes (poisson, œuf, moutarde, arachide, kiwi…), certains aliments présentent une allergénicité croisée (banane-kiwi-latex, par exemple).

La forme la plus caractéristique de cette allergie est l'intolérance aux protéines du lait de vache du nourrisson.

B. Mécanismes physiopathologiques

1. Les effecteurs

Ce sont :
- les Ac de type IgE. Ils se fixent sur les basophiles et les mastocytes, sur des récepteurs pour le fragment Fc, de haute et de faible affinité (RFcεRI et RFcεRII). RFcεRI a une structure tétramérique. La chaîne α se lie au Fc de l'IgE, les chaînes β et γ assurent la transduction du signal par l'intermédiaire de kinases. Ce récepteur est couplé à des motifs ITAM (*Immune Tyrosine Kinase Activation Module*), leur phosphorylation délivre un message activateur (*fig. 1*) ;
- les cellules qui possèdent le récepteur Fc des IgE. Les principales cellules impliquées dans l'HS sont les mastocytes conjonctifs (ou séreux) et muqueux. RFcεRI sur les basophiles et les mastocytes, RFcεRII sur les basophiles, mastocytes, éosinophiles, macrophages, plaquettes.

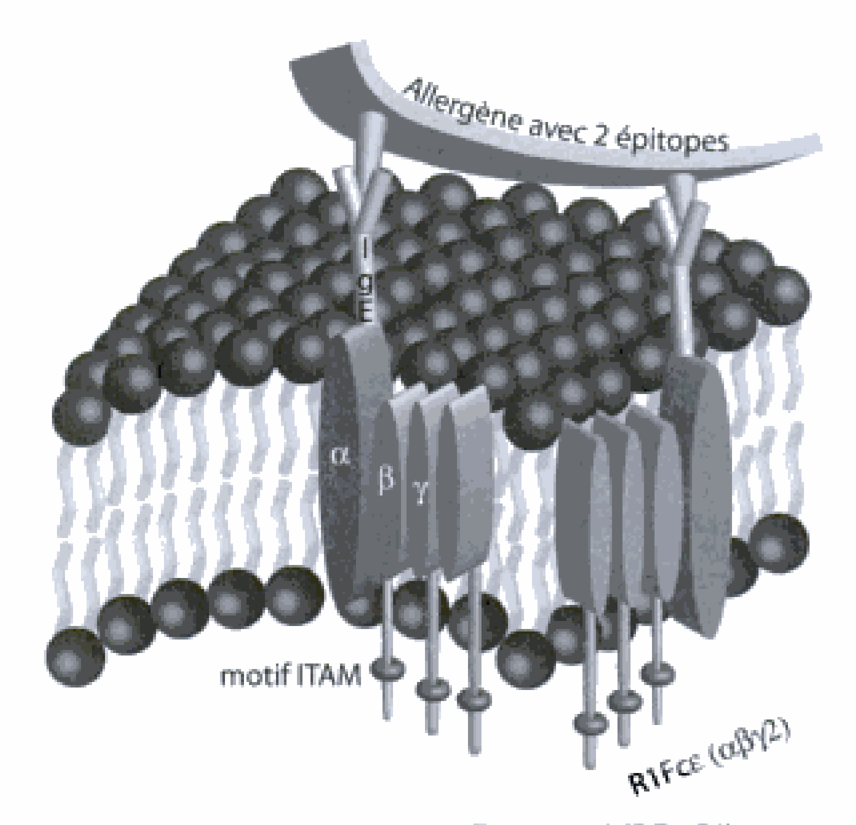


Figure 1. Le récepteur à IgE de type I (RFcεRI)

Après introduction de l'allergène dans l'organisme, celui-ci entraîne la synthèse d'IgE. Ces Ac ont une durée de vie courte dans l'organisme. En revanche, si ces Ac sont fixés sur des cellules (par leur fragment Fc), ils persistent plus longtemps.
Lorsque l'allergène est *réintroduit*, il se fixe sur les IgE, fixées sur les mastocytes dans le tissu conjonctif par exemple, et crée un pontage entre les IgE (*fig. 2*).
Cela induit :
• une agrégation des IgE en surface de la cellule ;
• une activation de la cellule ;
• une dégranulation avec libération du contenu des granules :

Histamine
Sérotonine } Responsables des manifestations
Leucotriènes...

Il existe donc une phase de latence après l'évènement sensibilisant, puis un 2e contact avec l'allergène qui déclenche la symptomatologie.

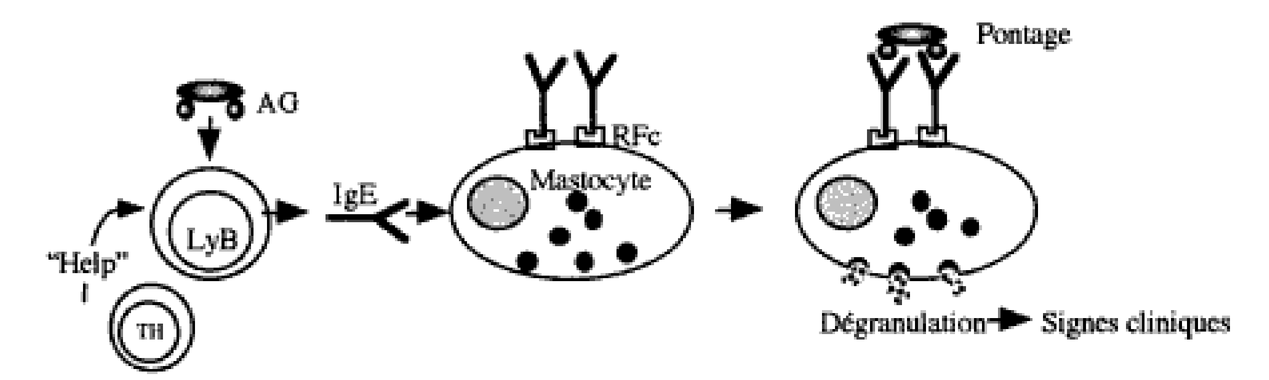


Figure 2. Schéma général de l'hypersensibilité de type I

Secondairement, les médiateurs préformés et néoformés, libérés lors de la dégranulation mastocytaire, permettent le recrutement par chimiotactisme de neutrophiles, éosinophiles et macrophages, qui dégranulent à leur tour et libèrent des molécules à activité destructrice pour l'épithélium (peroxydase) et qui augmentent le bronchospasme et la perméabilité vasculaire. Le syndrome clinique produit dépend de 3 variables : la quantité d'Ac présente, la voie par laquelle l'Ag est introduit et sa dose.

2. Les médiateurs

L'activation des basophiles/mastocytes entraîne la libération de médiateurs préformés dans les granules et la synthèse par les membranes de médiateurs néoformés (*fig. 3*).

a) Médiateurs préformés dans les granules

• Histamine : Dans l'HS de type I, l'histamine agit surtout sur des récepteurs H1 avec contraction des muscles lisses ayant pour conséquences :
  – une vasodilatation artériolo-capillaire par contraction des muscles lisses des veinules postcapillaires, avec augmentation de la perméabilité vasculaire,
  – une bronchoconstriction et une hypersécrétion bronchique,
  – une hypermobilité et hypersécrétion intestinale,
  – une action urticarienne ;
• Tryptase ;

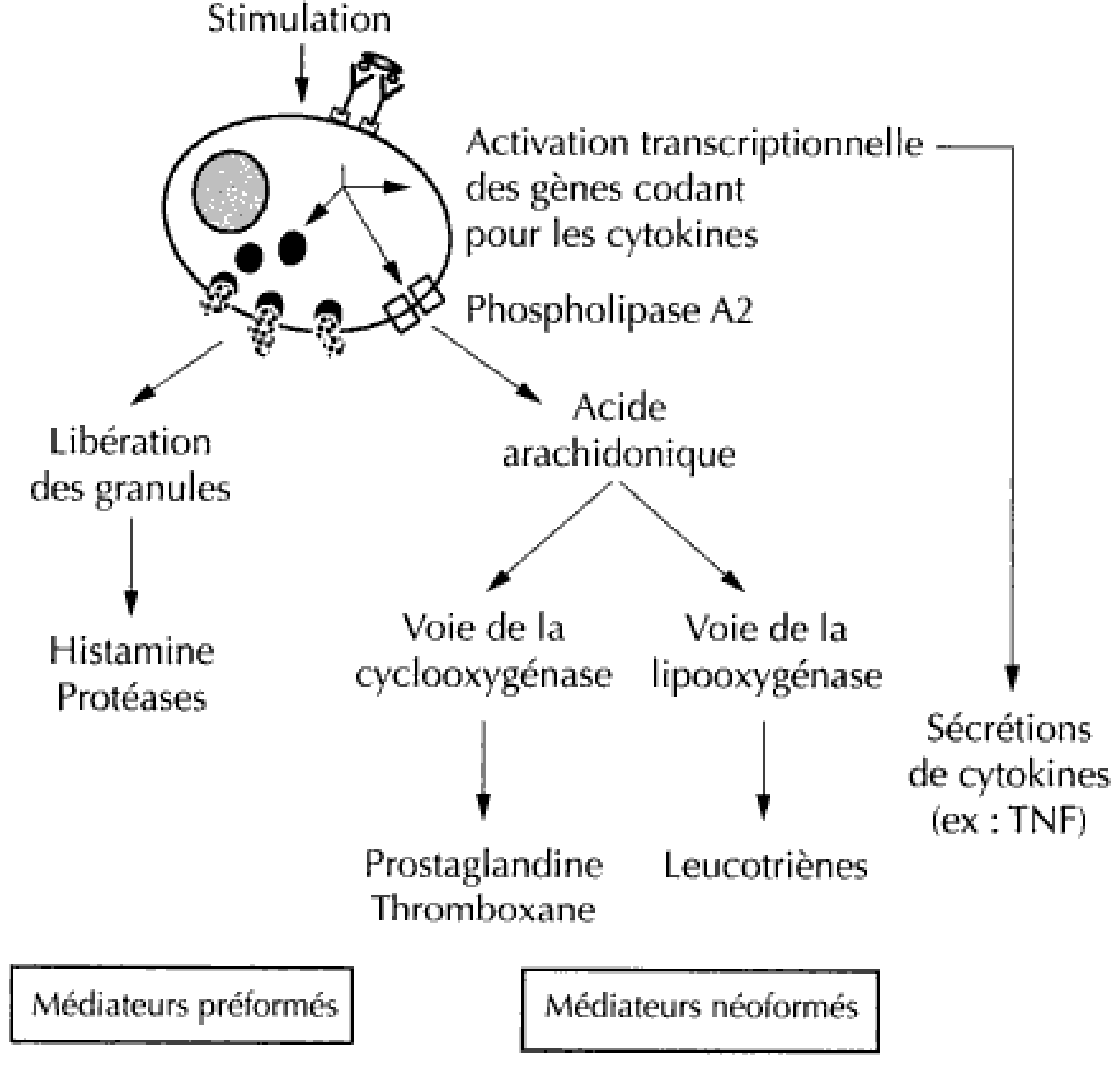


Figure 3. Activation des mastocytes

- Chymase ;
- Carboxypeptidase ;
- NCFA et ECFA : *neutrophil chemotactic factor of anaphylaxis* et *eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis.*
- Héparine.

b) Médiateurs néoformés issus de la membrane cellulaire

Ils proviennent des phospholipides membranaires hydrolysés par la phospholipase A2, avec libération d'acide arachidonique :
- leucotriène (LTC4) ;
- thromboxanes ;
- prostaglandines (PGD2) ;
- PAF acether (*platelet activating factor*).

c) Sécrétion de cytokines

- TNF, IL-4, produits par les mastocytes, favorisent l'inflammation et le recrutement des leucocytes ;
- IL-5, produite par les mastocytes et les Th2, active les éosinophiles ;

- IL-4 et IL-13, produites par les TH2, stimulent la commutation des lymphocytes B en cellules productrices d'IgE.

Les médiateurs pré et néoformés exercent donc différentes actions. Les médiateurs préformés sont responsables de la phase précoce de la maladie : libération rapide d'amines vaso-actives et contraction des fibres musculaires lisses. Les cytokines sont responsables de la phase retardée (recrutement de leucocytes et réaction inflammatoire persistante).

C. Diagnostic

Importance de l'interrogatoire :
- recherche d'un terrain familial particulier ;
- identification de l'allergène en cause (pneumallergènes, trophallergènes, médicaments). Cette identification n'est pas toujours évidente.

1. Tests cutanés : prick test et IDR

Ce sont des tests de référence.
Des solutions d'allergènes de dilutions connues sont appliquées sur la peau et introduites par voie ID.
La réaction locale dépendante des IgE est rapide, apparition d'une papule et d'un érythème réalisant une lésion urticarienne atteignant son maximum en 15 minutes.
Des témoins, négatif (sérum physiologique) et positif (histamine), encadrent la batterie de dilution de l'antigène à tester ; les résultats sont évalués de manière semi-quantitative. On commence par des dilutions élevées et, si le résultat est négatif, on augmente la concentration de l'allergène.
Ces tests *in vivo* représentent, lorsqu'ils sont possibles, la meilleure méthode d'exploration de l'allergie (en particulier des pneumallergènes courants responsables de rhinite ou d'asthme, et des allergènes alimentaires).

2. Tests de provocation

De réalisation délicate, ils sont longs et soumettent le malade à un réel inconfort. Il peut s'agir de tests d'inhalation (évaluation de la diminution de la fonction ventilatoire sans toutefois aller jusqu'à une véritable crise d'asthme), de tests alimentaires (addition d'un allergène à une alimentation préalablement déplétée en cet allergène), ou de tests muqueux (dépôt de l'allergène dans le nez, sur la conjonctive…).
Ces tests sont réservés aux laboratoires spécialisés où un traitement d'urgence peut être mis en œuvre. Ils sont surtout utilisés concernant l'asthme professionnel.

3. Dosages des IgE totales et spécifiques

a) IgE totales

- Le *Paper Radio Immuno Sorbent Test* (PRIST). Des anticorps anti-IgE, adsorbés sur un disque de papier, sont mis en présence du sérum à tester puis l'ensemble

est mélangé avec une solution d'anticorps anti-IgE radiomarqués. La quantité de radioactivité fixée sur le papier est proportionnelle aux taux d'IgE, et la valeur obtenue est comparée à celle donnée par un sérum étalon ;
- Des tests immunoenzymatiques fondés sur le même principe sont de plus en plus souvent employés.

Ce test n'est pas spécifique car les IgE sont élevées dans de nombreuses circonstances. Les IgE totales sont dosées dans l'eczéma atopique (où les valeurs peuvent être très élevées).

Les valeurs normales des IgE sont fonction de l'âge : < 150 ku/L chez l'adulte non allergique, beaucoup plus faible chez l'enfant (âge × 10, exemple à 2 ans < 20 ku/L).

b) IgE spécifiques

On cherche ici à identifier et à quantifier des IgE dirigées contre un allergène précis ; la révélation de la fixation de l'IgE spécifique sur l'allergène est appréciée à l'aide d'un anticorps anti-IgE marqué.

Le *Radio Allergo Sorbent Test* (RAST) (*fig. 4*) emploie du papier comme support d'allergène. Des disques de papier imprégnés d'allergène purifié sont, dans un premier temps, mis en contact avec le sérum à analyser puis, dans une seconde étape, sont incubés en présence d'une solution d'anti-IgE marqués. La radioactivité mesurée est proportionnelle à la quantité d'IgE fixée sur l'allergène.

Ce dosage ne peut être fait qu'après un interrogatoire minutieux lorsqu'on a une idée précise des Ag en cause.

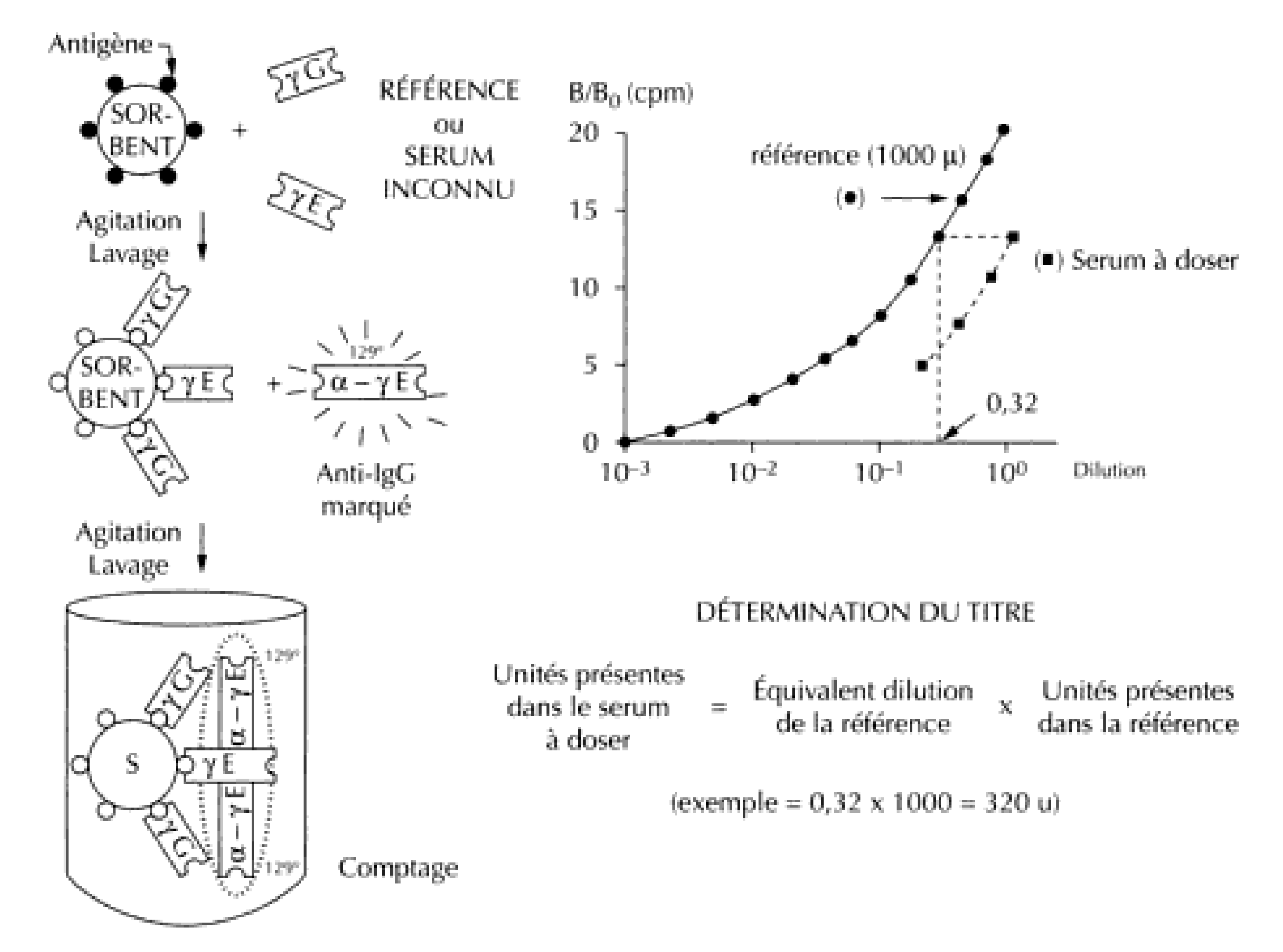


Figure 4. Principe du *Radio Allergo Sorbent Test* (RAST)

4. Dosages de l'histamine et de la tryptase

Des taux élevés d'histamine ou de tryptase peuvent confirmer une poussée allergique. L'histamine circulante est détruite très rapidement par des histaminases (une heure). Le prélèvement doit donc être fait au moment du choc. La tryptase reste élevée plus longtemps.

5. Test d'activation *in vitro*

Test d'activation *in vitro* des polynucléaires basophiles par l'allergène. On peut doser l'histamine ou les leucotriènes libérées.

D. Traitement

- Éviction de l'allergène à vie ;
- Désensibilisation ; L'injection SC de doses croissantes d'allergènes induit une augmentation de la synthèse des IgG (IgG4 surtout) et une baisse de celle des IgE. Le pontage par l'allergène des IgG fixées sur les récepteurs RFcγ des mastocytes inhibe leur dégranulation (récepteur inhibiteur de type ITIM) ;
- Antimédiateurs ;
- Traitements symptomatiques. Pour le choc anaphylactique, adrénaline et corticoïdes en urgence.

III. L'hypersensibilité de type II : réaction due aux Ac IgM et IgG

Cette HS implique des Ac dirigés contre un Ag fixé à la surface d'une cellule sanguine. La fixation de l'antigène induit la lyse de la cellule, soit par activation du complément et formation du complexe lytique terminal, soit par opsonisation et phagocytose par les macrophages (par le biais des RFc, récepteur au C).

Cette lyse des cellules du sang aboutit à :
- une anémie (lyse des globules rouges) : pâleur, dyspnée ;
- une leucopénie (lyse des globules blancs) : sensibilité aux infections ;
- une thrombopénie (lyse des plaquettes) : hémorragie.

En pathologie humaine, cette HS se manifeste sous 4 formes :
- lors d'incompatibilité transfusionnelle ;
- lors d'une allergie médicamenteuse où le médicament est fixé sur une cellule. L'Ac antimédicament se fixe sur le médicament, lui-même fixé sur la cellule sanguine. L'activation du complément détruit cette dernière ;
- lors d'anémie hémolytique d'origine auto-immune ;
- lors d'une maladie hémolytique périnatale : incompatibilité Rhésus.

Un cas rare peut être ajouté : le rejet de greffe hyperaiguë lorsque le receveur a des Ac préformés contre les Ag du greffon.

IV. Hypersensibilité de type III

Des réactions d'hypersensibilité de type III surviennent lorsque l'allergène est soluble. La pathologie est provoquée par le dépôt d'agrégats d'Ag-Ac appelés complexes immuns (CI). Ces complexes peuvent induire des lésions aux sites de leur formation ou à distance. En effet, ces CI peuvent circuler dans le sang et se déposer sur la paroi des vaisseaux à l'origine de vascularite, glomérulonéphrite, maladie sérique…
L'antigène peut-être :
- infectieux (angine à streptocoque, viral…) ;
- inhalé (pneumopathie d'hypersensibilité) ;
- endogène (maladie auto-immune comme le lupus érythémateux).

A. Mécanisme

L'Ag et l'Ac forment un complexe immun qui active le complément. Il s'ensuit une libération d'amines vaso-actives qui entraîne une rétraction de la cellule endothéliale et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Les modifications de la paroi endothéliale permettent aux CI de se déposer dans la paroi des vaisseaux. Cette localisation tissulaire, entre les cellules endothéliales, rend difficile leur phagocytose. Les CI se fixent aussi sur les RFc des plaquettes et entraînent leur agrégation.
Le modèle le plus typique de maladie par complexes immuns est la maladie sérique, qui guérit spontanément lorsque l'Ag a été éliminé.
L'injection de protéine sérique étrangère entraîne une réponse Ac. Ces Ac forment des CI avec les protéines étrangères qui sont encore dans la circulation sanguine. Ces CI activent le C, entraînant les signes cliniques. Les effets sont transitoires et se résolvent quand la protéine étrangère est éliminée.
Le maintien de l'Ag conduit au développement de maladies chroniques à CI.

B. Diagnostic

- L'examen de biopsie en immunofluorescence met en évidence les dépôts de CI dans les lésions ;
- CI circulants : la détection des CI circulants est aujourd'hui abandonnée au profit de la recherche des cryoglobulines ;
- Étude du complément : la diminution des fractions C3, C4 ou du facteur B est peu sensible. Le dosage du C3c permet de mettre en évidence le clivage de C3 par les CI.

V. L'hypersensibilité de type IV ou hypersensibilité retardée (HSR)

Elle est due à l'action de lymphocytes T spécifiques d'un Ag qui, après activation, sécrètent des cytokines provoquant la migration, l'activation et l'accumulation locale de lymphocytes et de macrophages.

Le modèle le plus étudié est celui de l'HS à la tuberculine, induite par l'exposition au bacille de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*) ou au vaccin BCG (souche atténuée de *Mycobacterium bovis* de Calmette et Guérin).

Elle est mise en évidence par le test tuberculinique : injection intradermique d'un dérivé purifié protéique de culture de bacilles tuberculeux. La réaction se manifeste par une induration érythémateuse qui atteint son maximum 48 heures après l'injection. La taille de l'induration peut varier de 4 mm à 25 mm et au-delà.

Quand on examine au microscope cette induration, on observe un infiltrat constitué de lymphocytes et de macrophages.

Le caractère retardé de cette HS est dû au temps nécessaire à la rencontre entre l'Ag fixé dans le derme et les rares lymphocytes T spécifiques circulants.

D'autres modèles mettent en jeu ces mêmes mécanismes :

- les dermites de contact dues à l'application sur la peau d'un haptène, et responsables d'un eczéma de contact (allergie au nickel, chrome, caoutchouc…) ;
- les hypersensibilités granulomateuses dues à la présence d'un Ag qui ne peut être éliminé par l'organisme sans traitement : tuberculose, lèpre, sarcoïdose, leishmaniose, maladie de Crohn, recto-colite hémorragique. Le processus survient entre 3 et 4 semaines après l'introduction de l'agent causal.

Elle peut succéder aux hypersensibilités précédentes.

Des réactions d'hypersensibilité de type IV peuvent aussi impliquer des cellules T CD8 qui lèsent principalement les tissus par une cytotoxicité à médiation cellulaire.

VI. L'hypersensibilité de type V

Elle est due à la stimulation d'un récepteur par un auto-Ac. Le récepteur se comporte comme un auto-Ag. Par exemple, les Ac antirécepteurs à la TSH dans la maladie de Basedow (hyperthyroïdie). Ces Ac ont le même effet que le ligand physiologique (agoniste) et activent la fonction hormonale.

D'autres auto-Ac peuvent avoir un effet inhibiteur (antagoniste) en bloquant l'accès de l'hormone (par exemple, Ac antirécepteurs à la TSH bloquants dans la forme atrophique de la thyroïdite auto-immune).

Puisque les récepteurs de la surface des cellules sont des protéines du soi, ce type d'hypersensibilité ne s'observe que dans les maladies auto-immunes.

Tous les types d'hypersensibilité se rencontrent dans l'auto-immunité à l'exception de l'HS de type 1, qui n'existe que dans l'allergie (les réponses de type IgE ne se rencontrent pas dans l'auto-immunité).

L'essentiel de la question

Les hypersensibilités sont classées selon le mécanisme responsable des lésions tissulaires. L'allergie (hypersensibilité immédiate ou de type I) est due à la production d'anticorps IgE dirigés contre des allergènes. Ces IgE se fixent sur les mastocytes qui dégranulent lors d'une deuxième exposition à l'allergène. Les manifestations cliniques et pathologiques sont dues aux médiateurs sécrétés par les mastocytes (amines vasoactives, médiateurs lipidiques) qui agissent sur les vaisseaux et les muscles lisses. L'inflammation (induite par des cytokines) correspond à la phase tardive de l'allergie. Le diagnostic est fait sur l'identification de l'allergène et les dosages des IgE totales et spécifiques.

Pour en savoir plus

- Abbas A.-K., Lichtman A.-H. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Paris, Elsevier 2005.
- Gould H.-J. *et al.* The biology of IgE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol* 2003 ; 21 : 579-628.
- Homberg J.-C. *Immunologie fondamentale*. Estem, 1999.
- Janeway C.-A., Travers P. *Immunologie*. De Boeck Université, Bruxelles, 1997.
- Kay A.-B. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med* 2001 ; 344 : 30-7.
- Kay A.-B. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001 ; 344 : 109-13.
- Revillard J.-P. *Immunologie* 3e éd. De Boeck Université, Bruxelles, 1998.

Exploration du système immunitaire

Les progrès de l'immunologie fondamentale ont conduit à un développement important des techniques destinées à l'étude des désordres immunologiques.
Les laboratoires d'immunologie emploient à l'heure actuelle non seulement des techniques qui leur sont propres mais aussi de nombreuses techniques communes à d'autres disciplines biologiques (notamment biochimiques). Les techniques immunologiques sont aussi largement utilisées dans beaucoup d'autres domaines de la biologie et de la médecine. L'emploi d'Ac pour détecter spécifiquement des molécules dans des mélanges complexes ou dans des tissus est particulièrement important.
Deux sources d'Ac peuvent alors être utilisées : les Ac monoclonaux qui ne reconnaissent qu'un seul épitope, et les Ac polyclonaux dont on devra contrôler la spécificité.
Les techniques immunologiques utilisent toutes la réaction antigène-anticorps (Ag-Ac), sur laquelle nous ferons un bref rappel.

I. Réaction antigène-anticorps

La réaction Ag-Ac est due à l'interaction réversible entre les épitopes de l'Ag et les paratopes de l'Ac. Elle dépend du nombre de sites Ac et Ag qui entrent en jeu. Elle fait intervenir quatre types de liaisons non covalentes : des liaisons hydrogènes, des liaisons électrostatiques, les forces de Van der Waals et des liaisons hydrophobes. La stabilité de toutes ces liaisons non covalentes est influencée par les conditions physico-chimiques du milieu. Elle est diminuée par l'augmentation de la température, de la force ionique, de l'osmolarité et l'abaissement ou l'augmentation du pH. Ces interactions moléculaires sont caractérisées par des constantes d'*association* et de *dissociation* mesurables, permettant de calculer l'*affinité* d'un Ac pour un Ag monovalent. L'affinité d'un Ac est la force avec laquelle un ligand monovalent se lie à un seul de ses sites spécifiques pour l'antigène.
La constante d'affinité KA à l'équilibre est définie par le rapport des concentrations molaires du complexe sur le produit des concentrations molaires du ligand et du récepteur.

$$\text{Ag} + \text{Ac} \rightleftharpoons \text{Ag-Ac}$$

$$KA = \frac{[\text{Ag-Ac}]}{[\text{Ag}][\text{Ac}]}$$

Cette valeur s'exprime en L/mol et varie de 10^4 L/mol (Ac de très faible affinité) à 10^{12} (Ac de très forte affinité).
Le changement d'un seul acide aminé au sein du paratope ou de l'épitope peut augmenter ou diminuer fortement l'affinité.
On parle d'*avidité* ou *affinité fonctionnelle* pour un antisérum constitué d'un mélange d'Ac d'affinités différentes et de spécificités épitopiques différentes. L'avidité d'un antisérum est beaucoup plus élevée que la somme des affinités de chaque Ac pour chaque épitope (*fig. 1*).
La spécificité d'un Ac vis-à-vis d'un Ag est dépendante de son affinité (ou de son avidité).
On distingue 2 grands types d'applications à la réaction Ag-Ac :
- *détection et dosage des antigènes* grâce à l'utilisation de solutions étalon d'Ag, le dosage pourra être exprimé en unité de masse ;

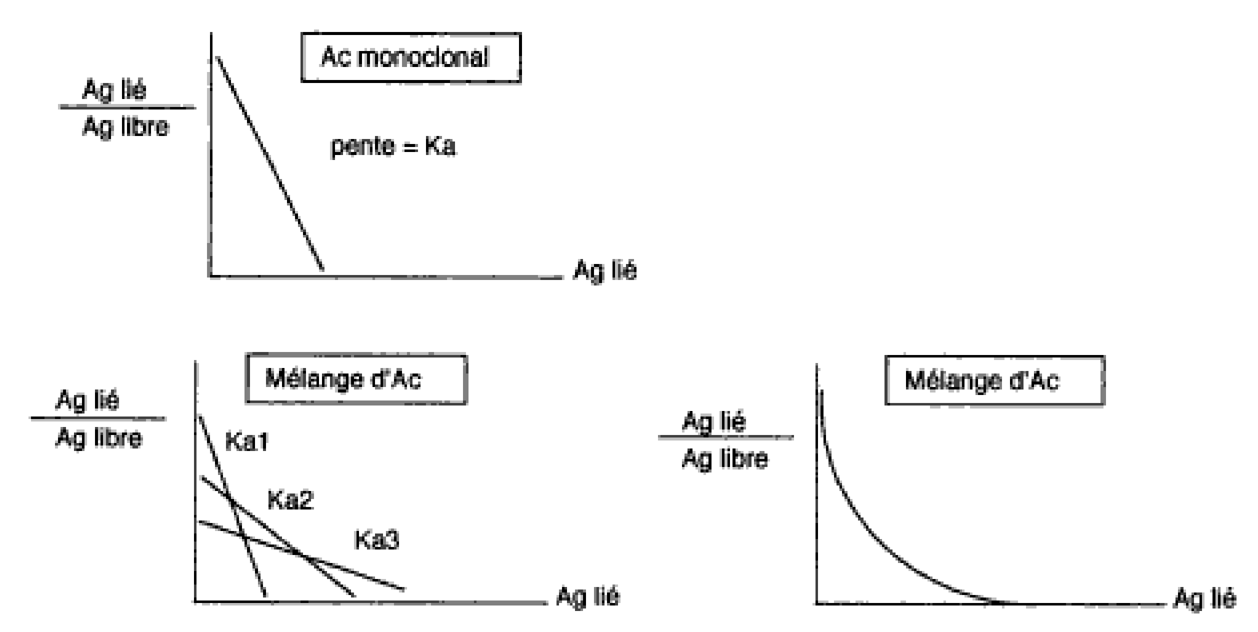


Figure 1. Mesure des interactions moléculaires. Méthode de Scatchard

- *détection et titrage d'Ac* vis-à-vis d'un Ag ou d'un mélange d'Ag. L'hétérogénéité de la réponse Ac ne permet pas d'exprimer les résultats en unité de masse. On définit une valeur seuil (méthode qualitative) ou un titre d'Ac (méthode semi-quantitative) qui correspond à l'inverse de la dernière dilution donnant une réaction positive. Le titre reflète à la fois la concentration des Ac et leur avidité.

  Certaines techniques mesurent directement la liaison de l'Ac à son Ag. Ces méthodes sont basées sur des interactions primaires. C'est le cas de la RIA (*radio immuno assay*) et de l'Elisa (*enzyme linked immunosorbent assay*). D'autres techniques déterminent la quantité d'Ac présents par les changements que ceux-ci provoquent dans l'état physique de l'Ag. Ces méthodes sont basées sur des interactions secondaires, c'est le cas de la précipitation d'Ag soluble ou de l'agglutination de particules antigéniques.

II. Principes généraux des différentes techniques immunologiques

A. Immunoprécipitation

Lorsque des quantités suffisantes d'Ac se lient à des Ag solubles multivalents, il se forme un réseau tridimensionnel qui précipite. Le précipité varie avec les proportions de réactifs et atteint son maximum à la zone d'équivalence (zone ou tout l'Ag et tout l'Ac se trouve dans le précipité).
En milieu liquide, la technique la plus utilisée est la néphélométrie, basée sur les propriétés de déviation de la lumière d'un rayon laser par des complexes immuns en milieu liquide.
Les méthodes de précipitation peuvent également être effectuées en milieu gélifié. L'Ag et l'Ac sont déposés dans des puits découpés dans un gel transparent. Les 2 réac-

tifs diffusent dans le gel et forment une ligne de précipitation à la zone d'équivalence. De nombreuses techniques dérivent de ce principe (immunodiffusion double ou technique d'Ouchterlony, immunofixation, immuno-électrophorèse, électrosynérèse, immunodiffusion radiale ou Mancini, électro-immunodiffusion selon Laurell).

B. Agglutination

La réaction d'agglutination met en présence des Ag portés par une cellule ou une particule et des Ac spécifiques agglutinants (IgM). L'Ag peut être naturellement présent à la surface de la particule (réaction d'agglutination directe, par exemple le typage des groupes sanguins), ou y être fixé artificiellement grâce à un agent de couplage. On parle alors d'agglutination passive. Les particules peuvent être des hématies de mouton (hémagglutination), des cristaux de cholestérol, des particules de latex (par exemple, détection des facteurs rhumatoïdes).

C. Techniques utilisant des Ac ou des Ag marqués

- Le marquage peut être réalisé par un fluorochrome (immunofluorescence), une enzyme (méthode immuno-enzymatique) ou un radio-isotope. Les techniques de marquage permettent d'une part de localiser un Ag au sein d'un tissu sur une coupe tissulaire ou sur un frottis de cellules, de rechercher un auto-Ac sérique (par exemple antinucléaire sur cellules HEp2) d'autre part, et de réaliser des dosages d'Ag ou d'Ac en solution (technique RIA, Elisa).
- La technique de l'immunotransfert ou western-blot consiste à faire migrer un mélange de protéines dans un champ électrique par électrophorèse en gel de polyacrylamide, puis à transférer ces protéines sur une feuille de nitrocellulose et à révéler les Ag à l'aide d'Ac marqués. Cette méthode permet également de mettre en évidence les Ac dirigés contre différentes protéines séparées en fonction de leur masse moléculaire. Ces Ac sont révélés par un 2^d Ac anti-Ig humaine. Cette méthode est couramment utilisée pour le diagnostic sérologique des infections par le VIH ainsi qu'en auto-immunité pour l'identification d'auto-Ac, à partir d'un mélange complexe d'Ag (par exemple, recherche d'Ac antinucléaire avec comme source antigénique un extrait de cellules HEp2, ou un extrait de thymus de veau).

III. Mise en évidence des facteurs humoraux intervenant dans la réponse immunitaire

De multiples molécules circulant dans les liquides biologiques sont les témoins d'une réponse immunitaire de l'organisme à la pénétration d'une substance immunogène. Les immunoglobulines (Ig) qui assurent l'immunité spécifique, le système du complément qui agit de manière non spécifique, les cytokines qui permettent à la réponse immunitaire de se développer ainsi que les complexes immuns, témoins de la réaction antigène-anticorps, peuvent être mis en évidence *in vitro*.

A. Détection des Ac

1. Méthodes qualitatives

- *L'électrophorèse des protéines* (sur acétate de cellulose ou sur agarose) permet d'apprécier la répartition des différentes classes de protéines et, plus particulièrement, de noter :
  - l'existence de grandes quantités de gamma-globulines, et la forme du pic de gamma-globuline permettant de détecter la présence d'une immunoglobuline monoclonale (pic étroit au niveau des gamma),
  - une absence de pic au niveau des gamma-globulines pouvant orienter vers l'existence d'une a- ou d'une dysgamma-globulinémie, l'association d'un syndrome inflammatoire qui peut être repéré par une augmentation du pic des α1-globulines ;
- *L'immuno-électrophorèse*, qui associe à la migration électrophorétique une immunodiffusion suivie d'une précipitation immunologique sous forme d'arcs, doit venir compléter l'examen précédent lorsqu'un pic monoclonal de gamma-globulines vient d'être visualisé. Cette méthode permet de préciser la nature des immunoglobulines monoclonales. On réalise pour cela une série d'immuno-électrophorèses avec une batterie d'immunsérums monospécifiques d'un isotype donné ;
- *L'immunofixation* associe l'électrophorèse classique en agarose, réalisée dans une première étape, à une précipitation immunologique à l'aide d'immunsérums spécifiques anti-isotype d'Ig. La coloration au bleu de Coomassie révélera, s'il y a une bande de précipitation, la production monoclonale d'un isotype donné ;
  Cette méthode est plus sensible, plus rapide et d'interprétation plus facile que l'immuno-électrophorèse pour le diagnostic des Ig monoclonales.

- *Cas particuliers*
  - *Macroglobulinémie* : Des hautes concentrations en IgM (souvent rencontrées dans la macroglobulinémie de Waldenström) entraînent la solubilisation des complexes antigène-anticorps ;
  - *Cryoglobulinémie* : Les cryoglobulines sont des protéines qui précipitent au froid et qui se trouvent sous forme dissoute à 37 °C. L'électrophorèse du précipité permet de typer la cryoglobulinémie :
    - type I constituée exclusivement d'Ig monoclonales IgG, IgA ou IgM,
    - type II mixte avec au moins une Ig monoclonale,
    - type III exclusivement polyclonale ;
  - *Pyroglobulinémie* : Les pyroglobulines (IgG, IgM, IgA) sont des protéines qui précipitent à 56 °C et qui sont insolubles à froid. Elles sont fréquemment associées à la maladie de Kahler ;
  - *Protéinurie de Bence-Jones* : Les myélomes multiples s'accompagnent de la production de chaînes légères monoclonales qui sont éliminées dans les urines en raison de leur faible masse molaire (ces chaînes légères précipitent à 56 °C et se redissolvent à 100 °C). Le typage de ces chaînes est réalisé par immuno-électrophorèse ou par immunofixation des urines préalablement concentrées.

2. Méthodes quantitatives

- *Dosage des Ig totales*. Il s'agit du dosage de l'ensemble des Ig d'un liquide physiologique, sans préjuger de leur isotype ou de leur spécificité. Les techniques d'immunoprécipitation sont les plus utilisées, notamment la néphélométrie et l'immunodiffusion radiale selon Mancini.
- *Dosage pondéral des isotypes des immunoglobulines* : les IgG, IgA et IgM sont les isotypes les plus fréquemment rencontrés tant dans le sérum que dans les sécrétions ; les IgD ne sont que très rarement recherchées. La mesure de ces fractions repose sur des techniques d'immunoprécipitation à l'aide d'antisérums monospécifiques dirigés contre un seul type de chaîne lourde (donc un seul isotype).
  Le cas particulier des IgE a été traité dans le chapitre sur l'hypersensibilité.

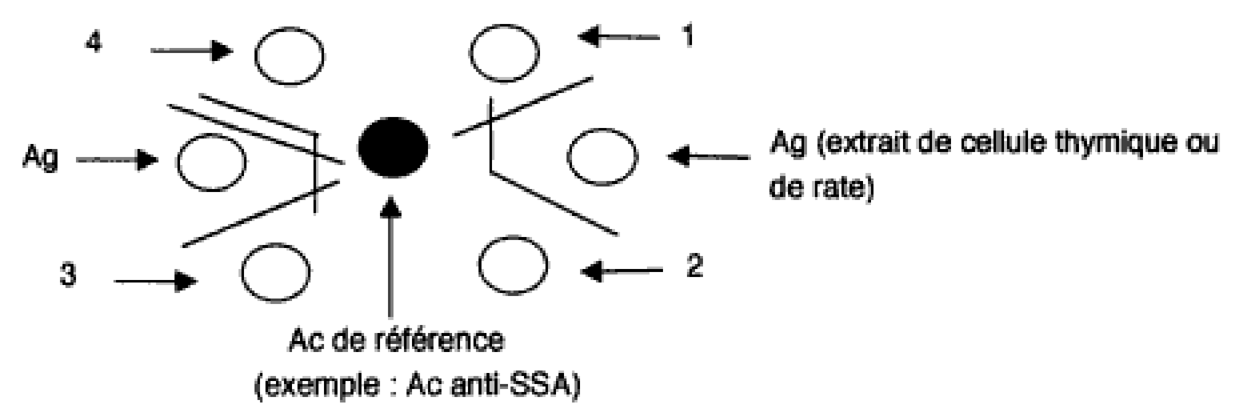
3. Recherche et titration d'Ac spécifiques

La présence d'Ac spécifiques peut signer :

- une réponse anormale à un antigène normalement tolérogène (allergène alimentaire...) ;
- un contact antigénique préalable avec des agents infectieux ;
- l'apparition d'une réaction auto-immune dirigée contre ses propres cellules. Le principe de ces tests est simple, il s'agit de déterminer la spécificité des immunoglobulines d'un individu vis-à-vis d'un antigène parfaitement défini qui pourra être un allergène, un médicament, une bactérie, un virus, un parasite, un champignon ou un autoantigène.
  Dans le cas d'un autoantigène, la cible antigénique n'est pas toujours identifiée, ce qui peut nécessiter l'utilisation de mélanges antigéniques complexes.

Les techniques utilisables sont nombreuses. Nous citerons :

- *l'agglutination* : l'agglutination passive est utilisée en auto-immunité. La détection des facteurs rhumatoïdes par la réaction de Waaler-Rose ou par le test au latex a été traitée dans le chapitre « La polyarthrite rhumatoïde » ;
- *la précipitation* : la technique d'Ouchterlony est encore aujourd'hui la technique de référence pour la détection des Ac antiantigènes nucléaires solubles (*fig. 2*) ;



1, 2, 3, 4 : Sérums à typer.
2, 4 : Ac anti-SSA. Réaction d'identité.
1, 3 : Ac antinucléaire différent de l'Ac anti-SSA. Réaction de non-identité.
4 : Le sérum 4 possède 2 Ac antinucléaires différents : 1 Ac anti-SSA + 1 Ac non identifié.

Figure 2. Détection des Ac anti-nucléaires solubles par Ouchterlony

- *la fixation du complément* est encore utilisée, en particulier pour la quantification des anticorps témoins d'une primo-infection ou d'une vaccination ;
- *l'immunofluorescence indirecte (IFI)* reste irremplaçable pour la détection des auto-Ac spécifiques et non spécifiques d'organes. Les substrats antigéniques peuvent être des cultures cellulaires (par exemple, cellules HEp2 pour la détection des Ac antinucléaires, polynucléaires humains pour la détection des ANCA – Ac anticytoplasmes des polynucléaires neutrophiles), ou des coupes d'organes (par exemple, foie, rein, estomac de rat pour la détection des Ac antitissus, coupe de pancréas humain pour la détection des Ac anti-îlots de Langerhans...).
  Le sérum à tester est déposé sur le substrat antigénique, lui-même fixé sur une lame de microscope (*fig.* 3). Après lavage, le complexe Ag-Ac est révélé par une anti-immunoglobuline humaine marquée à un fluorochrome (isothiocyanate de fluorescéine, rhodamine). La lecture s'effectue au microscope à fluorescence et permet de déterminer le titre de l'Ac et l'aspect de la fluorescence (par exemple, Ac antinucléaire d'aspect homogène, moucheté, nucléolaire...) ;

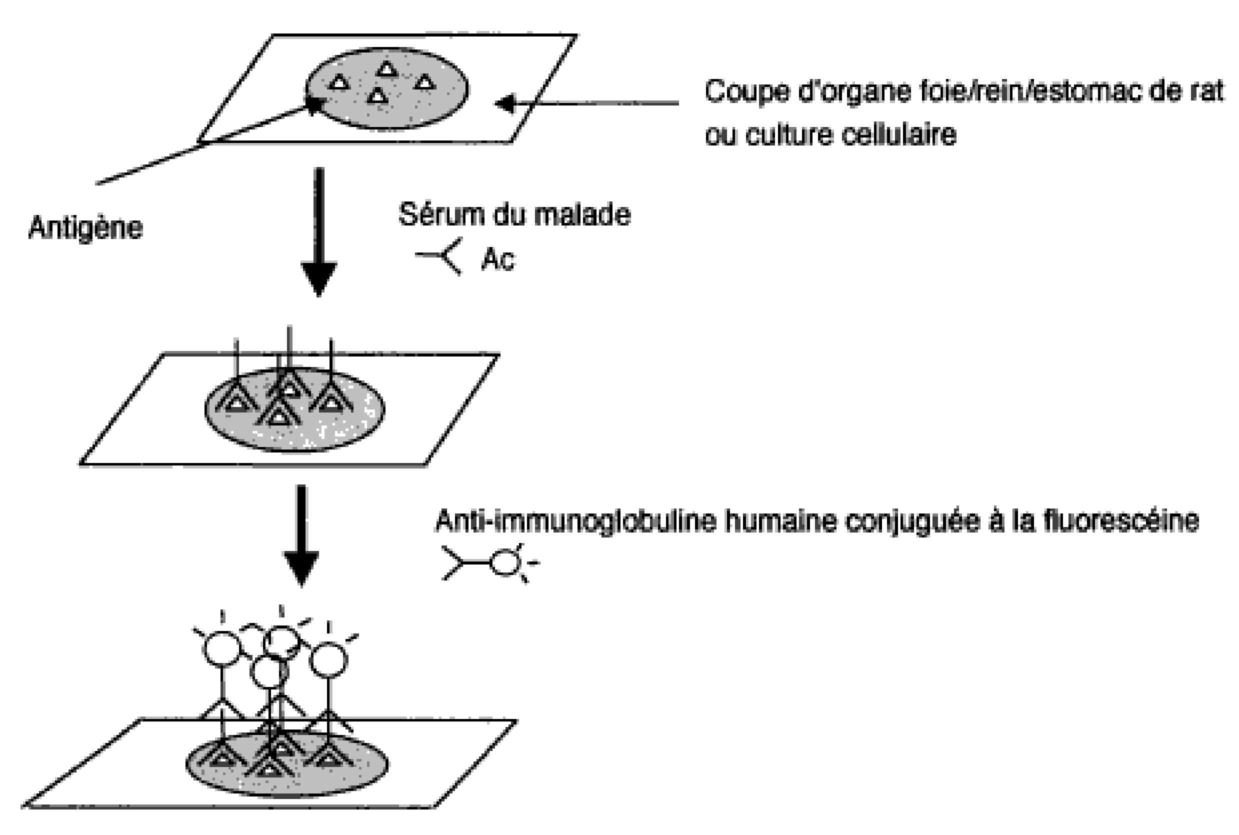


Figure 3. Principe de l'immunofluorescence indirecte

- *les techniques immuno-enzymatiques* et notamment l'*enzyme linked immunosorbent assay* (Elisa) peuvent être employées. La technique est identique à celle utilisée pour l'IFI ; l'antigène est ici fixé sur une cupule en plastique et l'anticorps révélant la fixation d'Ig spécifiques sur l'antigène est cette fois couplé à une enzyme (péroxydase, phosphatase...).
  Des techniques de dot-blot utilisant la nitrocellulose comme support se sont beaucoup développées, ainsi que le western-blot ou immunotransfert ;
- *des techniques radio-immunologiques* sont encore employées ; il s'agit soit de méthodes compétitives classiques (compétition entre un antigène, les anticorps

du malade et des anticorps de mêmes spécificités marqués), soit des méthodes non compétitives où, cette fois, l'antigène est marqué. Ce dernier principe est à la base du test de Farr qui permet de détecter des autoanticorps anti-ADN natif. Ces derniers sont des marqueurs diagnostics très spécifiques du lupus érythémateux disséminé (LED). L'ADN marqué est mis en présence du sérum du malade. Le sulfate d'ammonium précipite les complexes Ag-Ac tandis que l'Ag libre ou l'Ac non complexé demeure en solution. La radioactivité contenue dans le précipité est proportionnelle à la quantité d'auto-Ac présents.

B. Étude du complément

Le complément (C) est constitué de protéines solubles et membranaires susceptibles de s'activer en cascade par la voie alterne (immunité non spécifique) ou par la voie classique. L'activation du C joue un rôle essentiel dans l'inflammation, l'opsonisation des micro-organismes, l'élimination des complexes Ag-Ac, la présentation des Ag et la régulation de la réponse immunitaire. Cette activation du C est contrôlée par un ensemble de protéines régulatrices solubles ou membranaires.
L'exploration biologique du complément fait appel à des dosages *antigéniques* et à des dosages *fonctionnels*. La qualité du prélèvement est importante (prélèvement sur EDTA, tubes conservés dans la glace pendant moins de 3 heures, centrifugés à froid et conservés à – 80 °C).

1. Dosages antigéniques

Dosages immunochimiques (néphélométrie, Elisa) de chacune des protéines prises individuellement. Les plus fréquemment dosées sont C3, C4, C1 inhibiteur.

2. Dosages fonctionnels

a) CH50 (mesure du complément total)

Il explore les protéines de la voie classique et de la voie terminale commune. C'est la plus petite quantité de plasma capable d'entraîner la lyse de 50 % d'un nombre donné de GR de mouton, sensibilisés par des Ac hétérologues (dosage de l'hémoglobine libérée).
La méthode doit être standardisée (*fig. 4*) (sensibilisation des hématies, témoins à utiliser, durée de l'hémolyse).
Les résultats sont exprimés en % par rapport à la lyse obtenue en présence d'un pool de plasma de sujets normaux. Normes : 100 % ± 30.

b) Dosage hémolytique : activité fonctionnelle spécifique de chaque protéine du complément

À l'heure actuelle, seul le dosage fonctionnel du C2 (C2H) permet d'explorer cette protéine (il n'existe pas de dosage antigénique).
Les GR de mouton sensibilisés sont recouverts des protéines du C précédant le composant à doser, puis ajout du plasma et des composants suivants en excès. Le degré d'hémolyse est proportionnel à la quantité de protéine à doser (*fig. 5*).

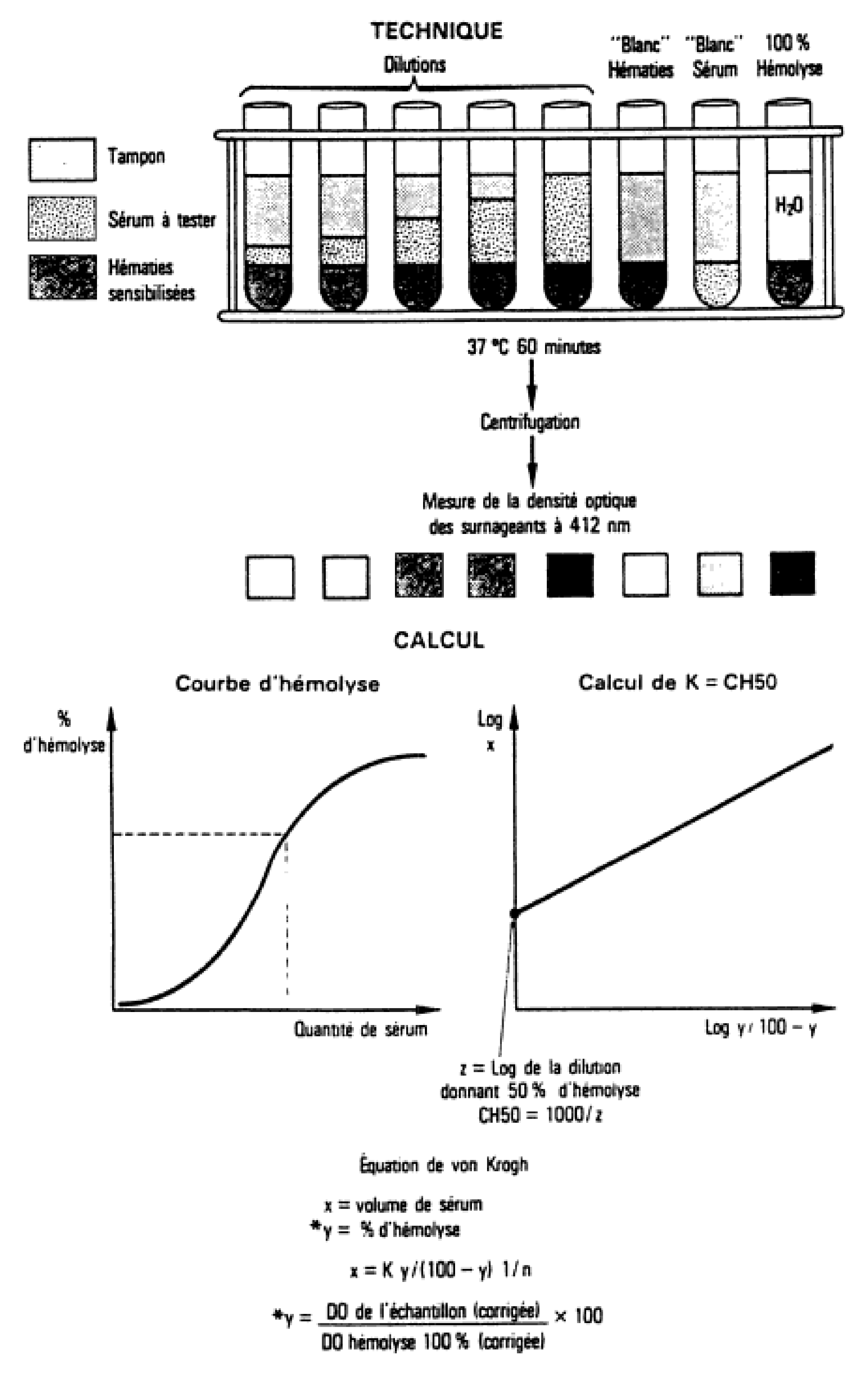


Figure 4. Dosage du complément hémolytique total – Calcul de la CH50

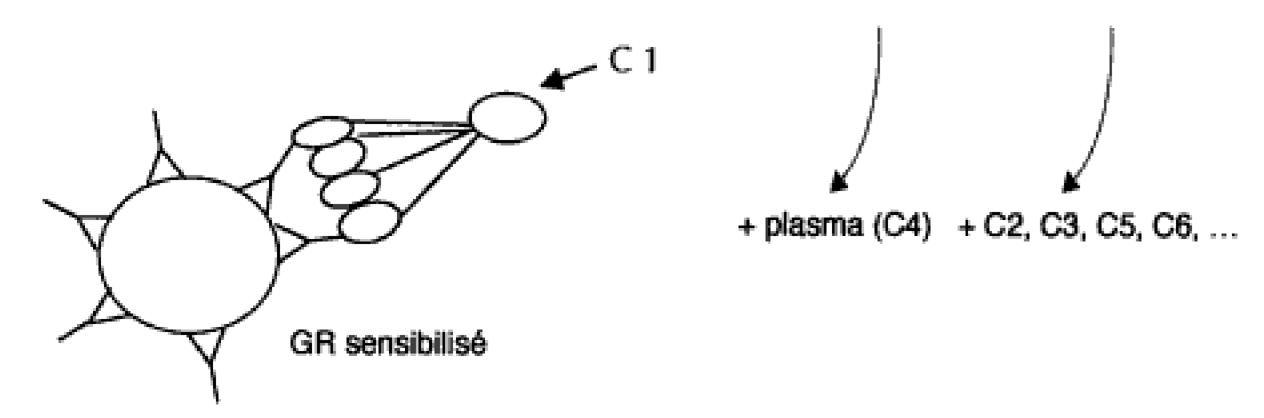


Figure 5. Dosage du C4H

c) Interprétation

Elle doit tenir compte des dosages antigéniques et fonctionnels. Le 1[er] test de dépistage est réalisé en effectuant CH50, C3, C4 et C1 inhibiteur.

- Une augmentation du taux sérique du C s'observe au cours de diverses affections inflammatoires ou infectieuses ;
- Une baisse du C est souvent due à un excès de catabolisme (LED, maladies à complexes immuns…) ;
- Les études génétiques permettent la mise en évidence des déficits congénitaux. Les déficits génétiques partiels en C4 sont fréquents dans les pathologies auto-immunes ;
- Les déficits en C3 entraînent des infections bactériennes récidivantes.

C. Recherche des complexes immuns circulants

Leur recherche n'est plus effectuée et a été remplacée par la recherche des cryoglobulines.

IV. Étude phénotypique et fonctionnelle des cellules du système immunitaire

Cytologiquement, les lymphocytes sanguins ont une morphologie homogène (petites cellules rondes, avec un noyau dense et un cytoplasme réduit). Ces cellules comprennent cependant de nombreuses sous-populations fonctionnellement très différentes qui peuvent être identifiées sur la base de l'expression différentielle de molécules membranaires. Ces molécules peuvent être détectées au moyen d'anticorps monoclonaux. Ainsi, on peut distinguer les lymphocytes T (CD3) et B (CD19) et parmi les lymphocytes T, les CD4 et CD8…
Des modifications quantitatives ou qualitatives des populations cellulaires sanguines peuvent traduire une modification de l'état immunitaire : une augmentation ou une diminution des lymphocytes ainsi que des anomalies fonctionnelles peuvent être observées au cours d'une infection, d'une pathologie spécifique d'organe, d'une pathologie tumorale ou d'un déficit immunitaire.

Il est donc intéressant de dénombrer et d'évaluer les capacités fonctionnelles des cellules jouant un rôle dans les réponses immunes afin de :
- détecter un déficit immunitaire ;
- suivre l'évolution des cellules immunocompétentes (Sida, transplantation, traitement immunosuppresseur) ;
- caractériser une population cellulaire maligne (leucémies et lymphomes) ;
- caractériser des cellules infiltrant un tissu.

A. Étude phénotypique des cellules du système immunitaire

1. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est aujourd'hui la technique la plus performante pour caractériser le phénotype des cellules du système immunitaire.
Un cytomètre permet de donner des informations sur chaque cellule individuelle, de les compter et éventuellement de les trier selon certains critères (FACS = *fluorescence-activated cell sorter*). Cet appareil est composé d'un système fluidique, optique, électronique et informatique. Le système fluidique permet d'entraîner la suspension cellulaire à l'intérieur d'une chambre d'analyse, ou buse. Suivant le principe d'hydrofocalisation, le flux contenant la suspension cellulaire est entraînée passivement dans un second flux appelé liquide de gaine. Chaque cellule est ainsi individualisée et défile devant un faisceau laser. Chaque cellule passant devant le laser émet des signaux lumineux qui sont enregistrés grâce à un système de filtres et de photomultiplicateurs qui transforment le signal lumineux émis en signal électrique (*fig. 6*). Cet appareil permet ainsi de recueillir pour chaque cellule des informations concernant sa taille, sa structure et la fluorescence émise par les fluorochromes associés aux anticorps qui se sont fixés sur la cellule (*fig. 7*).

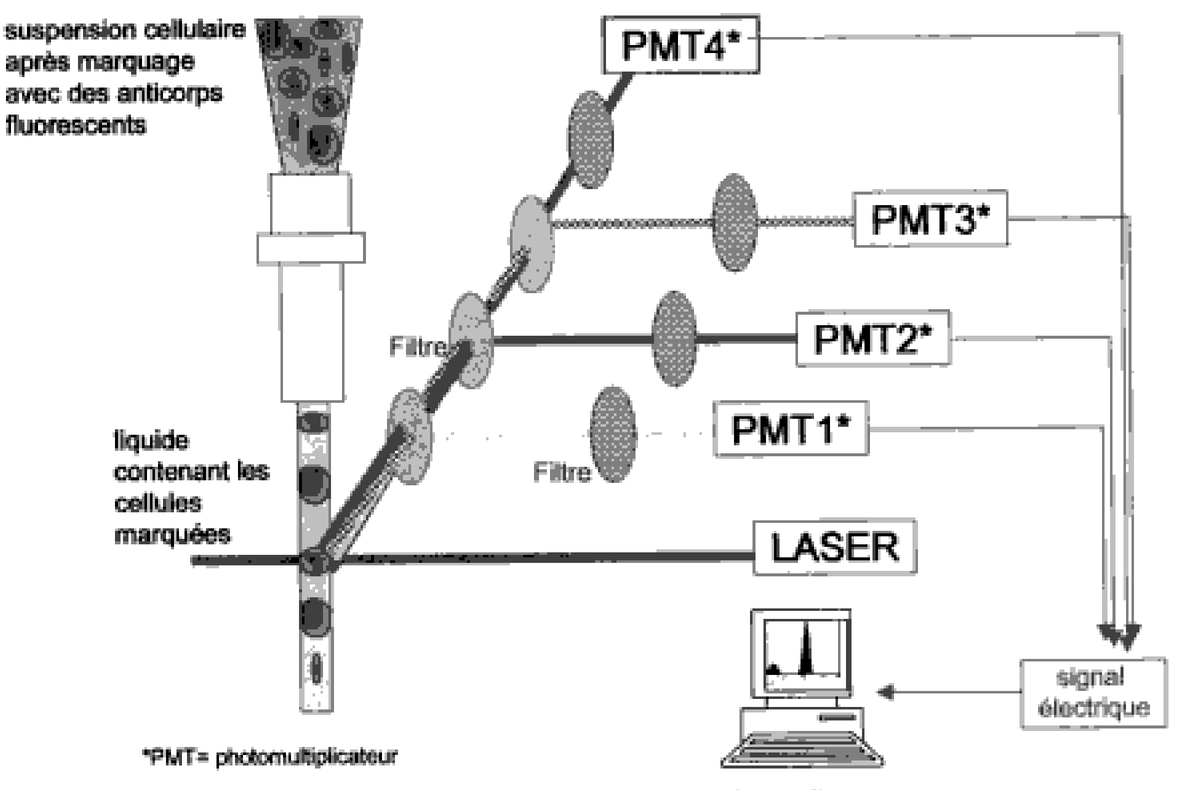


Figure 6. Principe de la cytométrie en flux

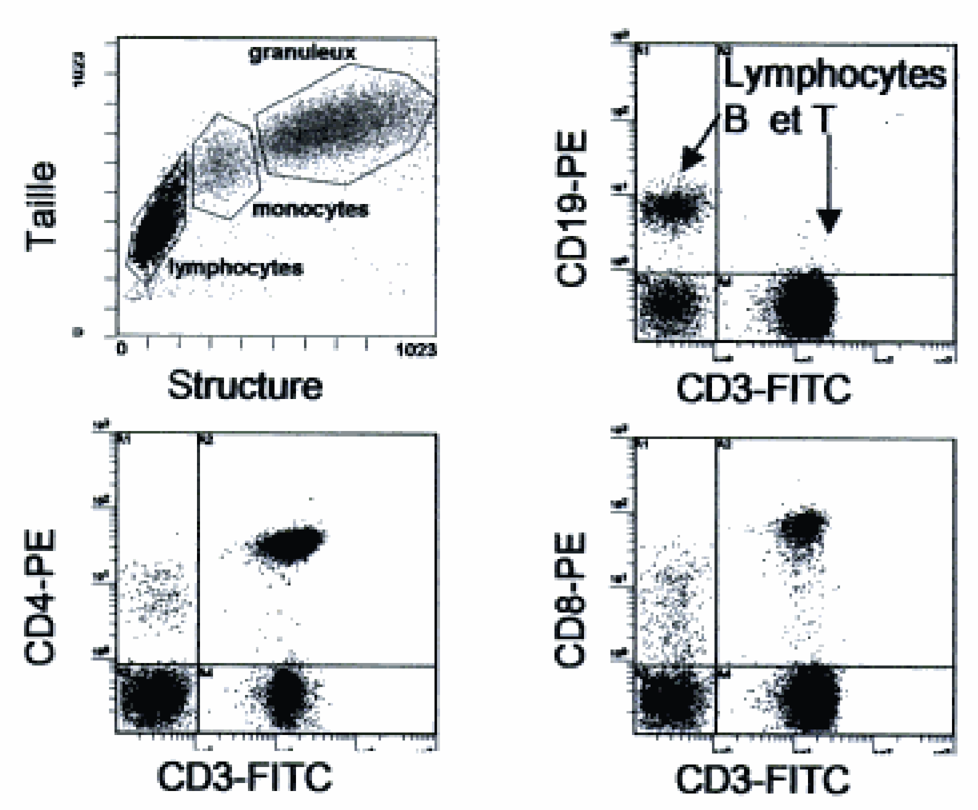


Figure 7. Représentation biparamétrique des populations lymphocytaires en cytométrie de flux

Les cellules d'un échantillon sont donc préalablement marquées à l'aide d'anticorps couplés à un fluorochrome spécifique de molécules exprimées par les cellules (par exemple, anticorps anti-CD4) puis analysées sur un cytomètre de flux. L'utilisation de plusieurs anticorps couplés à des fluorochomes différents permet ainsi de réaliser une analyse multiparamétrique d'une suspension cellulaire hétérogène (*fig. 7*). Cette technique permet de plus d'associer à un marquage de molécules membranaires des marquages intracytoplasmiques (par exemple, cytokines intracellulaires) ou nucléaires (analyse de la viabilité ou du cycle cellulaire par marquage de l'ADN).

Par sa capacité à analyser un très grand nombre de cellules, le cytomètre en flux donne des renseignements quantitatifs sur les cellules exprimant les marqueurs étudiés, il permet également de définir le niveau d'expression de ces molécules par ces populations cellulaires.

Cette technique est largement utilisée en immunologie, elle permet par exemple de dénombrer les lymphocytes T CD4+ au cours du suivi des patients infectés par le VIH, de caractériser des proliférations lymphocytaires (leucémies et lymphomes), de dénombrer les lymphocytes T et B au cours de déficit immunitaire.

Tableau 1. Répartition normale des sous-populations lymphocytaires sanguines

		$/mm^3$
Lymphocytes		1 000 à 4 000
Lymphocytes T CD3+	60 à 80 %	1500 ± 300
Auxiliaires : CD4+	30 à 60 %	900 ± 200
Cytotoxiques : CD8+	15 à 30 %	650 ± 200
Lymphocytes B : CD19+	5 à 15 %	300 ± 60
Cellules NK : CD16+ et CD56+	5 à 15 %	300 ± 60

L'analyse des cellules sanguines par cytométrie en flux peut se faire sur sang total hépariné après lyse des hématies, ou après isolement des cellules mononucléées (lymphocytes et monocytes) par centrifugation sur une solution Ficoll-Hypaque.

2. Isolement des cellules mononucléées du sang

Le sang total prélevé sur anticoagulant est dilué dans une solution saline puis déposé sur une solution de Ficoll-Hypaque de densité 1,077. Après centrifugation, les hématies et les polynucléaires qui ont une densité plus élevée se déposent au fond du tube, alors que les cellules mononucléées (lymphocytes et monocytes) forment un anneau à l'interface Ficoll-plasma et peuvent ensuite être recueillies et analysées (*fig. 8*).

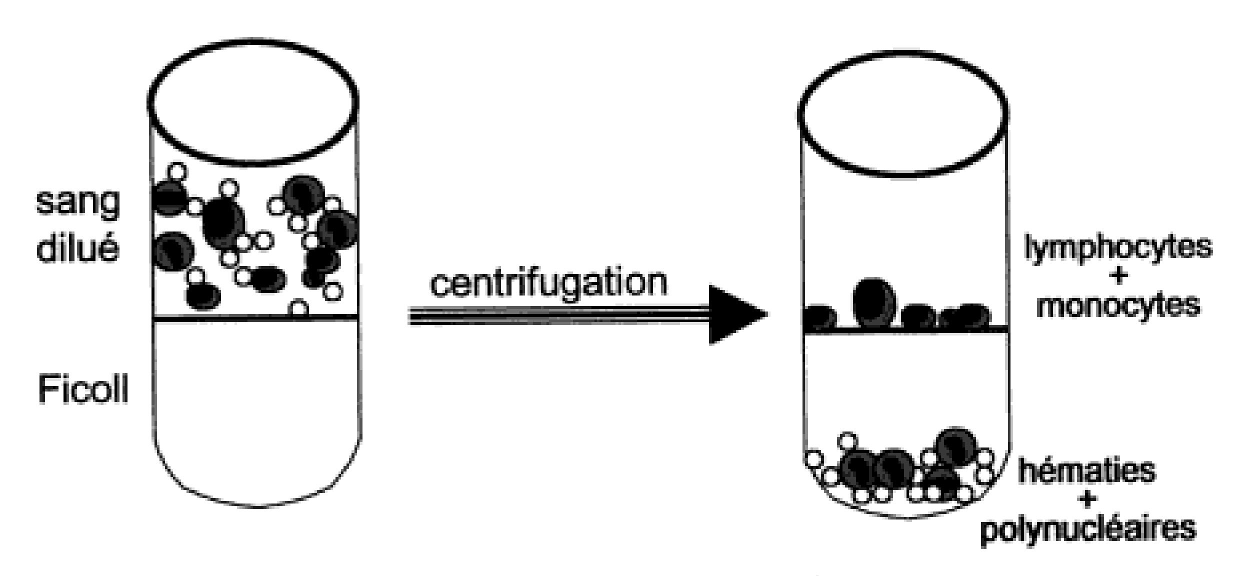


Figure 8. Séparation des cellules mononucléées du sang

B. Tests fonctionnels

Pour être efficace, les rares lymphocytes spécifiques d'un antigène doivent proliférer et se différencier en cellules effectrices en nombre suffisant.

1. Test de prolifération lymphocytaire

Pour étudier les capacités fonctionnelles des lymphocytes, on provoque *in vitro* leur activation et leur prolifération par des mitogènes polyclonaux (phytohémagglutinine, concanavaline A, *pokeweed mitogen*) ou des antigènes spécifiques (tuberculine, candidine, toxine tétanique...).
Ce test consiste à mettre en culture des cellules mononucléées du sang durant 3 jours en présence d'un mitogène, ou durant 6 jours en présence d'un antigène spécifique. On quantifie ensuite la prolifération cellulaire (synthèse d'ADN) par l'incorporation d'un nucléotide radioactif (thymidine tritiée = ^{3}H-thymidine). L'incorporation de ^{3}H-thymidine est mesurée grâce à un compteur β et permet de calculer un index de prolifération (*fig. 9*). Afin d'éviter l'utilisation de radioactivité, on peut également utiliser un analogue non radioactif de la ^{3}H-thymidine, le bromodéoxyuridine (BrdU).

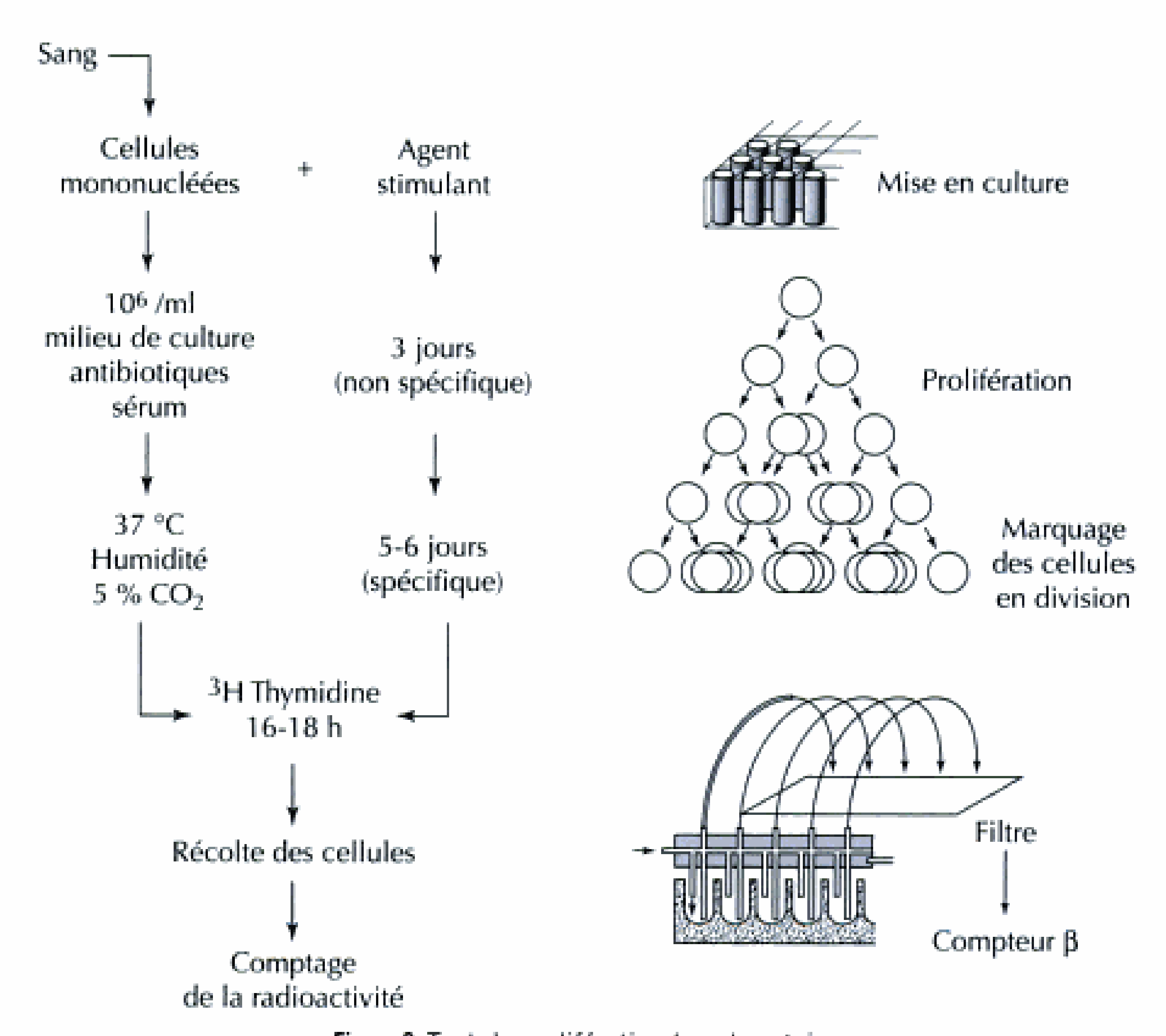


Figure 9. Test de prolifération lymphocytaire

L'incorporation de BrdU peut être détectée en cytométrie en flux après perméabilisation et marquage des cellules avec un anticorps anti-BrdU couplé à un fluorochrome. Cette dernière méthode permet de déterminer le pourcentage de cellules ayant proliféré, et éventuellement de définir le phénotype des cellules qui ont répondu à la stimulation.
Les tests de prolifération lymphocytaire peuvent être réalisés au cours de l'exploration d'un déficit immunitaire. La stimulation de lymphocytes T par des antigènes spécifiques permet de vérifier les réponses T après immunisation.

2. Test de cytotoxicité lymphocytaire

La fonction des lymphocytes T cytotoxiques est déterminée par l'étude de leur capacité à induire la mort de cellules cibles autologues. Les cellules cibles portant un antigène sont marquées au chrome 51 (^{51}Cr) et l'activité cytotoxique des lymphocytes est évaluée en mesurant le relargage du 51Cr par les cellules cibles détruites.

3. Production de cytokines par les lymphocytes

L'activation des lymphocytes T CD4+ par un antigène ou un mitogène se traduit par leur prolifération et leur différenciation en cellules auxiliaires qui sécrètent des cytokines. Les cytokines peuvent être dosées en Elisa dans les surnageants des cultures des lymphocytes T activés, ou en déposant directement les cellules sur une surface recouverte d'anticorps spécifiques contre la cytokine. La cytokine libérée est captée par l'anticorps et sera révélée par l'addition d'un second anticorps anti-cytokine marqué. Par cette méthode appelée Elispot, la cytokine libérée par chaque cellule prend l'aspect d'un point coloré.
L'Elispot peut également être utilisé pour détecter la sécrétion d'anticorps par des lymphocytes B : l'anticorps est piégé en recouvrant la surface par l'antigène vis-à-vis duquel il est spécifique et révélé par une anti-immunoglobuline marquée.
La cytométrie en flux permet également d'étudier la production de cytokines par des lymphocytes après activation. Les cytokines sont détectées après perméabilisation et marquage des cellules par un anticorps anti-cytokine couplé à un fluorochrome. Cette dernière méthode permet de détecter simultanément la production de plusieurs cytokines par une même cellule et d'y associer un marquage membranaire pour déterminer le phénotype des cellules ayant répondu à la stimulation.

4. Autres tests fonctionnels

En dehors des lymphocytes, d'autres cellules interviennent au cours des réponses immunes. Ce sont les cellules phagocytaires (polynucléaires et monocytes-macrophages) et les cellules présentatrices d'antigène (CPAg = cellules dendritiques et monocytes-macrophages) qui peuvent être phénotypées en cytométrie en flux.
L'étude de leurs propriétés fonctionnelles a un intérêt dans l'exploration de déficits immunitaires ou pour la recherche d'éléments favorisant l'apparition d'infection.

5. Capacité de présentation de l'antigène aux lymphocytes T

Elle est évaluée en réalisant un test de prolifération lymphocytaire. Les CPAg sensibilisées par un antigène sont mises en culture en présence de lymphocytes T autologues. La prolifération des lymphocytes T est proportionnelle à la capacité de présentation des CPAg.

6. Mesure du chimiotactisme

Différentes molécules d'origine bactérienne ou leucocytaire orientent la migration des phagocytes du sang vers le site d'une infection ou d'une inflammation. La capacité de migration des phagocytes en réponse à un facteur chimiotactique peut être évaluée en utilisant une chambre de Boyden séparée par une membrane poreuse. La suspension cellulaire (polynucléaires neutrophiles ou monocytes) est placée au-dessus du filtre et un facteur chimiotactique dans le compartiment inférieur. Après un temps de migration, on mesure le nombre de cellules ayant traversé la membrane. Le syndrome des leucocytes paresseux, qui est dû à un déficit de mobilité des polynucléaires neutrophiles, se caractérise par la survenue d'infections récurrentes.

7. Mesure de la phagocytose

Une anomalie de la phagocytose conduit également à la survenue d'infections graves et répétées. La capacité des phagocytes à capter des éléments étrangers est évaluée en incubant ces cellules avec des particules de nature ou de taille différente (dextran, billes de latex, bactéries opsonisées ou non…). La mise en évidence des particules phagocytées peut être réalisée au microscope ou de plus en plus souvent en cytométrie en flux, grâce à l'utilisation de particules fluorescentes.

8. Mesure de la bactéricidie

L'exploration de « l'explosion oxydative » des phagocytes est réalisée par un test de réduction du nitrobleu de tétrazolium (microscopie, chimioluminescence ou cytométrie) ou par la réduction de ferricytochrome inhibée par la superoxyde dismutase. Au cours de la maladie granulomateuse chronique, les phagocytes ne peuvent produire de radical superoxyde, de sorte que leur activité antibactérienne est sérieusement compromise.

V. Stratégie d'étude des principaux dérèglements du système immunitaire

Ce chapitre est destiné à illustrer, à partir de quelques exemples, comment peut être utilisée l'immunologie biologique dans certaines situations cliniques.
Les exemples choisis sont l'exploration des déficits immunitaires chez l'enfant et le typage des leucémies et des lymphomes. L'hypersensibilité et les maladies auto-immunes font l'objet de chapitres distincts.

A. Exploration des déficits immunitaires chez l'enfant

Le diagnostic doit être envisagé selon l'âge, le contexte clinique et l'existence ou non d'antécédents familiaux.
Les déficits immunitaires héréditaires peuvent toucher les cellules immunitaires (T, B et NK), les cellules phagocytaires et enfin, les composants du complément.
Dans les familles où l'on connaît un cas de déficit immunitaire congénital, on peut envisager un diagnostic anténatal dans des centres très spécialisés.
En l'absence d'antécédent familial, les déficits immunitaires peuvent se traduire par une absence de prise de poids, des diarrhées, des infections récidivantes (infection du poumon, infection ORL récidivante, candidose…). Les déficits en complément se manifestent par des infections à *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*. Les déficits en lymphocytes B se compliquent d'infections bactériennes extracellulaires et parasitaires (*Giardia intestinalis*).
Le premier examen est la NFS (mais une NFS normale ne permet pas d'écarter le diagnostic de déficit immunitaire), ainsi que le dosage des immunoglobulines.
Tout tableau évocateur de déficit immunitaire sévère chez le nourrisson impose l'hospitalisation rapide dans un service d'immunologie pédiatrique.

B. Typage des leucémies et lymphomes

Les syndromes immunoprolifératifs sont des pathologies malignes des cellules des lignées lymphoïdes qui partagent des caractéristiques morphologiques et phénotypiques avec les lymphocytes T ou B normaux à divers stades de leur maturation.
Le typage des hémopathies malignes par cytométrie en flux représente aujourd'hui un complément indispensable aux analyses cytologiques et anatomopathologiques, et il a permis d'établir une classification plus précise de ces syndromes. Il permet, grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux, de mettre en évidence des molécules membranaires ou intracytoplasmiques spécifiques de lignée ou correspondant à un stade de différenciation.
Dans le cas des hémopathies lymphoïdes chroniques, l'étude des lymphocytes sanguins ou médullaires permet d'une part, de mettre en évidence une prolifération lymphocytaire B ou T (augmentation du pourcentage de cellules) et d'autre part, de caractériser cette prolifération.
La LLC est une maladie du sujet âgé due généralement à une prolifération monomorphe de lymphocytes B. Ces cellules expriment le plus souvent la molécule CD5 qui caractérise une sous-population de lymphocytes B normaux. On retrouve également fréquemment l'expression du CD23 associée à une faible expression du CD22, CD79b et des immunoglobulines de surface. Ce profil phénotypique caractéristique permet de distinguer la LLC B des autres pathologies lymphoïdes chroniques (lymphomes).
Au cours des lymphomes, l'expression de certains marqueurs mise en évidence par cytométrie en flux permet d'orienter le diagnostic :
- lymphome du manteau ; CD5–, CD23+ ;
- lymphome folliculaire : CD10+ ;
- leucémie à tricholeucocytes : CD11c+, CD25+, CD103+ ;
- myélome : CD38+, CD138+.

Dans tous les cas de prolifération lymphocytaire B, la mise en évidence d'une restriction de l'expression de la chaîne légère (monotypie kappa ou lambda) est en faveur d'une prolifération clonale.
Le diagnostic phénotypique de lymphomes T est plus délicat et se caractérise principalement par une expression anormale des marqueurs panT (CD2, CD3, CD5 ou CD7).

C. Étude de clonalité et de remaniements géniques

L'expression d'immunoglobulines ou du TCR par les lymphocytes B ou T s'accompagne de réarrangements de l'ADN qui associe des segments de gènes éloignés du génome (rapprochement de segments V, D et J dont l'association forme un segment VDJ codant pour la partie variable des chaînes du TCR ou des Ig). À cette diversité combinatoire s'associe une diversité de jonction entre les segments V, D et J réarrangés, qui assure l'originalité de chaque réarrangement. Chaque cellule B ou T utilisera une combinaison particulière qui sera maintenue dans l'ensemble de sa descendance (clone).
En pathologie, les proliférations monoclonales B ou T seront donc caractérisées par la présence d'un clone cellulaire qui exprime le même récepteur. La preuve de la clonalité des proliférations lymphocytaires B ou T est apportée par l'étude des

réarrangements des gènes des Ig ou du TCR par des techniques de biologie moléculaire (PCR, southern-blot). Ces méthodes très sensibles révèlent un réarrangement unique prouvant le caractère clonal de la prolifération cellulaire.
Certaines proliférations lymphocytaires sont parfois associées à des remaniements chromosomiques qui peuvent être mis en évidence par cytogénétique, ou par des techniques de biologie moléculaire. Il s'agit le plus fréquemment de translocations chromosomiques qui associent des loci d'immunoglobulines à des gènes qui régulent la croissance cellulaire. Dans le lymphome de Burkitt, on observe une translocation (8 ;14) qui met en contact l'oncogène c-myc aux gènes des Ig. Une translocation (14 ;18) qui associe l'oncogène bcl-2 au locus IgH est fréquemment retrouvée au cours des lymphomes folliculaires.

L'essentiel de la question

Les techniques immunologiques utilisent toutes la réaction antigène-anticorps. Le plus souvent on utilise un marquage préalable de l'antigène, de l'anticorps ou d'une immunoglobuline pour visualiser les complexes immuns formés. Les techniques les plus utilisées sont l'immunofluorescence, l'immunoenzymologie et la radio-immunologie.
L'exploration de l'immunité humorale utilise de nombreux tests : détection qualitative ou quantitative des immunoglobulines, dépistage, titration et identification d'anticorps spécifiques, exploration du complément faisant appel à des dosages antigéniques et à des dosages fonctionnels.
L'étude phénotypique des cellules du système immunitaire utilise la cytométrie en flux. Cette technique permet par exemple, de dénombrer les CD4 au cours du suivi des patients VIH, de caractériser des proliférations lymphocytaires (leucémies et lymphomes), de dénombrer les lymphocytes T et B au cours de déficit immunitaire.
Les tests fonctionnels tels que les tests de prolifération lymphocytaire peuvent être réalisés au cours de l'exploration d'un déficit immunitaire.

Pour en savoir plus

- Homberg J.-.C. *Immunologie médicale*. Estem, 2001.
- Janeway C.-A., Travers P. *Immunologie*. De boeck université, Bruxelles, 1997.
- Revillard J.-P. *Immunologie*. De boeck université, 3[e] éd., Bruxelles, 1998.

Maladies auto-immunes : exemple de la polyarthrite rhumatoïde

C. JOHANET, E. BALLOT
Laboratoire d'immunologie et d'hématologie biologiques, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris.

Longtemps considérée comme une éventualité rare, la survenue de maladies auto-immunes (MAI) constituerait aujourd'hui le troisième grand processus pathologique après les maladies cardio-vasculaires et les cancers. Chaque année, des maladies plus ou moins bien comprises sont expliquées par la découverte d'une anomalie auto-immune.
La polyarthrite rhumatoïde, prise comme exemple est une maladie fréquente et invalidante dont le diagnostic doit être le plus précoce possible.

I. Maladies auto-immunes : généralités

L'existence de MAI est la conséquence d'un dérèglement de la reconnaissance du soi, avec activation de lymphocytes T et B autoréactifs. Cette rupture de la tolérance peut survenir dans des circonstances très variées. Chez l'homme, il s'agit d'affections multifactorielles incluant un trouble immunitaire, des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux (vieillissement, hormonaux, bactériens…).
Ces MAI sont caractérisées par la production d'autoanticorps (auto-Ac), c'est-à-dire d'immunoglobulines capables de reconnaître les constituants du soi. Les manifestations cliniques qui les caractérisent sont la conséquence directe des mécanismes immunologiques effecteurs *(tab. 1)*. Mais les auto-Ac ne sont pas obligatoirement pathogènes (auto-Ac naturels chez les sujets sains, auto-Ac chez les malades en rémission…) et nombre de MAI sont liées aux lymphocytes T autoréactifs. Cependant, quelles que soient les relations des autoanticorps avec le mécanisme étiopathogénique, ceux-ci représentent des marqueurs extrêmement sensibles et précoces pour le diagnostic de la maladie.

Tableau 1. Mécanismes lésionnels des auto-Ac

Mécanismes	Maladies
1. Action directe sur la cellule cible – complément dépendante – phagocytose – ADCC – apoptose	 Myasthénie Anémie hémolytique auto-immune – AHAI Thyroïdite Sclérodermie
2. Blocage fonctionnel – blocage fonctionnel membranaire – blocage fonctionnel d'une enzyme	 Thyroïdite, myasthénie Addison
3. Stimulation fonctionnelle	Basedow, pemphigus
4. Formation de complexes immuns	Lupus, glomérulonéphrites
5. Pénétration intracellulaire	Lupus, hépatite auto-immune

Les MAI sont classées en deux grandes catégories *(tab. 2)* : les *maladies spécifiques d'organes* qui ont une expression clinique directement liée à l'organe atteint (1 seul organe cible) et les *maladies non spécifiques d'organes* qui ont une expression mul-

tifocale liée à l'atteinte simultanée de plusieurs organes. Ces dernières comprennent essentiellement les connectivites et certaines vascularites.
Ces affections différentes dans leur mode d'expression clinique présentent néanmoins des caractères communs (manifestations systémiques, fatigue, fièvre, myalgie, atteinte articulaire). La polyarthrite rhumatoïde, que nous prendrons comme exemple de maladie auto-immune, fait partie des connectivites.

Tableau 2. MAI spécifiques et non spécifiques d'organes

MAI non spécifiques d'organes	MAI spécifiques d'organes	
	Maladie	Organe cible
Connectivites		
– Polyarthrite rhumatoïde	Anémie de Biermer	Estomac
– Lupus	Maladie cœliaque	Intestin
– Maladie de Gougerot-Sjögren	Hépatite auto-immune	Foie
– Sclérodermie	Cirrhose biliaire primitive	
– Polymyosite	Basedow	Thyroïde
– Dermatomyosite	Thyroïdite d'Hashimoto	
– Syndrome de Sharp	Addison	Surrénale
	DID	Pancréas
Syndrome des antiphospholipides	Pemphigus	Peau
	Myasthénie	Muscle
Vascularites primitives		
– Maladie de Wegener		
– Microangiopathie		

II. Polyarthrite rhumatoïde (PR)

A. Clinique

C'est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. La PR touche 0,8 % de la population et 2 % des sujets âgés avec une prédominance féminine nette. Il existe 2 pics d'âge vers 30 et 50 ans.
Les critères diagnostiques de la PR ont été définis en 1956 par l'ARA (American rheumatism association) puis modifiés par l'ACR (American college of rheumatology) (*tab. 3*). Le diagnostic peut être fait sur l'association d'au moins 4 des 7 critères, dont les critères 1 à 4 présents depuis au moins 6 semaines. À la phase initiale, il s'agit d'une oligoarthrite distale intéressant surtout les mains. Les douleurs se manifestent le matin au réveil et s'atténuent peu à peu dans la journée pour réapparaître le soir.
Le diagnostic doit être posé dès le début de la maladie pour éviter l'apparition des lésions destructives graves et irréversibles des articulations et le développement de manifestations systémiques extra-articulaires.

B. Étiopathogénie

La PR est liée à un trouble auto-immunitaire à double composante cellulaire et humorale et à localisation essentiellement articulaire. Un agent microbien ou viral est suspecté sur un terrain génétique prédisposé. Si on ne sait rien sur le premier, le rôle de gènes est démontré au moins pour les gènes HLA de classe II. La PR est associée à HLA-DR1 avec le gène DRB1*0101 et HLA-DR4 (DRB1*0401, 04, 05). Les facteurs rhumatoïdes (FR) synthétisés au niveau intra-articulaire et synovial participent à la composition des complexes immuns synoviaux qui sont capables de fixer le complément, et entraînent une migration des polynucléaires et des cellules mononucléées. La phagocytose des complexes immuns libère des enzymes lysosomiales qui déclenchent l'inflammation et la réaction synoviale. Dans l'inflammation synoviale intervient également la libération des cytokines à partir des différentes cellules activées.

Tableau 3. Critères diagnostiques de la polyarthrite rhumatoïde par l'ACR (*American college of rhumatology*, 1997)

Critères	Définition
1. Raideur matinale	Raideur matinale articulaire ou périarticulaire durant au moins 1 heure.
2. Arthrite d'au moins 3 articulations	Gonflement simultané d'au moins 3 articulations, constaté par un médecin et résultant d'une hypertrophie des tissus mous ou d'un épanchement articulaire (et non de la seule hypertrophie osseuse). 14 articulations ou groupes d'articulations sont à prendre en compte : interphalangiennes proximales (IPP), métacarpophalangiennes (MCP), poignets, coudes, genoux, chevilles, métatarsophalangiennes (MTP).
3. Arthrite touchant la main	Gonflement conforme à la définition sus-jacente d'au moins un des groupes articulaires suivants : poignet, MCP, IPP.
4. Arthrite symétrique	Atteinte simultanée et bilatérale des articulations ou groupes d'articulations définis dans le critère 2 (l'atteinte bilatérale des IPP, MCP ou MTP est acceptable, même en l'absence d'une symétrie parfaite).
5. Nodules rhumatoïdes	Nodosités sous-cutanées constatées par un médecin sur des crêtes osseuses ou des surfaces d'extension, ou en situation périarticulaire.
6. Présence de facteur rhumatoïde	Mise en évidence d'une quantité anormale de facteur rhumatoïde dans le sérum, par une technique dont le résultat est positif chez moins de 5 % des sujets normaux.
7. Signes radiologiques	Anomalies radiographiques typiques de la polyarthrite rhumatoïde sur des clichés postéro-antérieurs des mains et des poignets, avec érosions osseuses et ostéoporose périarticulaire certaine prédominant sur les articulations touchées.

C. Diagnostic

Le diagnostic précoce d'une PR va être initialement clinique ou clinico-radiographique et doit être considéré comme une relative urgence pour espérer l'efficacité thérapeutique optimale.

Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique est essentiellement fait sur la recherche des **auto-Ac**. Celui-ci a évolué en 2002 avec l'apparition de nouveaux tests performants comme les Ac antipeptides cycliques et citrullinés (anti-CCP).
À ce jour, seuls les **FR** et les **Ac anti-CCP** ont une réelle utilité pratique. Les Ac antifilagrine sont progressivement abandonnés.

Les **antinucléaires** qui peuvent être présents dans 15 % des cas doivent être recherchés pour éliminer différents diagnostics différentiels, en particulier une polyarthrite lupique, un syndrome de Gougerot-Sjögren ou une sclérodermie.

1. Facteurs rhumatoïdes

Découverts par Waaler en 1937, ils ont été les premiers marqueurs diagnostiques utilisés et font partie des critères de l'ACR.
Les FR classiques sont des ***IgM anti-IgG***, non inhibés par les IgG natives, ils réagissent vis-à-vis du Fc des IgG modifiées par leur fixation à leur antigène, ou par l'agrégation par la chaleur.
Il existe en clinique 2 types de facteurs rhumatoïdes :
- d'une part des facteurs rhumatoïdes monoclonaux qui proviennent de lymphoproliférations monoclonales (maladie de Waldenström, cryoglobulinémie) ;
- d'autre part des facteurs rhumatoïdes polyclonaux qui sont trouvés dans le sérum des patients atteints de PR et d'autres maladies inflammatoires.

Différentes méthodes sont utilisées pour les mettre en évidence :
- *Agglutination* : les méthodes classiques utilisent l'agglutination des particules inertes recouvertes d'IgG. **La *réaction de Waaler-Rose***, découverte par Waaler en Suède et par Rose aux États-Unis, utilise des globules rouges de mouton sensibilisés par des IgG de lapin anti-GR de mouton. **La *réaction au latex*** utilise des particules de latex sensibilisées par des IgG humaines modifiées par la chaleur. Les 2 réactions sont faites systématiquement, le test au latex est plus sensible mais moins spécifique que le Waaler-Rose pour le diagnostic de PR ;
- *Elisa* : plus sensible, c'est la seule technique qui permette la détection des rares FR de classe IgG, IgA ou IgE.

Les FR distinguent les PR séropositives (75 à 90 % des cas) en général plus sévères et les PR séronégatives (20 % des cas). Cependant, les FR sont absents au cours des premiers mois d'évolution de la maladie chez plus de la moitié des patients.
L'autre point faible est leur manque de spécificité. Ils peuvent être détectés dans de nombreuses affections auto-immunes en particulier le syndrome de Gougerot-Sjögren (40 à 80 % des cas) et à un degré beaucoup moindre le lupus, la sclérodermie, certaines hémopathies lymphoïdes chroniques, dans des infections bactériennes ou parasitaires.

2. Ac antifilagrine

Ils regroupent les Ac *antistratum corneum* ou *antikératine*, recherchés par immunofluorescence indirecte (IFI) sur œsophage de rat, et les Ac *antipérinucléaires*, recherchés par IFI sur des frottis de cellules de la muqueuse buccale humaine. Leur sensibilité (30 à 55 %) est inférieure à celle des FR mais ils peuvent être détectés chez 20 à 30 % des polyarthrites séronégatives (sans FR), en particulier dans les formes débutantes. Ils présentent en outre une bonne spécificité. La présence de ces Ac serait associée aux formes les plus actives ou les plus sévères des PR.
La filagrine et ses précurseurs citrunillés ont été identifiés en 1993 comme la cible moléculaire majeure de ces autoanticorps.
Cette identification a permis le développement des anti-CCP par Elisa.

3. Ac antipeptides cycliques et citrullinés (CCP)

Ces Ac, détectés par Elisa avec comme Ag un précurseur cylique et citrulliné de la filagrine, sont plus spécifiques et d'une sensibilité égale ou supérieure à celle des FR (Se : 50 à 80 %, Sp : 85 à 98 %). Ils sont présents dans les formes débutantes où ils constituent un marqueur pronostique (marqueur d'érosion).
Actuellement, c'est la combinaison des anti-CCP et des FR qui offre les performances optimales pour le diagnostic de PR.
Enfin, les Ag citrullinés se sont récemment beaucoup diversifiés (protéines ou peptides, cycliques ou non, dérivés de la filagrine mais aussi de la vimentine, de la fibrine, télopeptides du collagène...). La combinaison des dosages utilisant des cibles citrullinées de nature différente pourrait encore augmenter les performances de sensibilité de ces marqueurs.

D. Évolution

Des titres élevés de FR, d'antifilagrine ou d'anti-CCP sont un facteur de mauvais pronostic car ils sont associés à des polyarthrites destructrices, parfois compliquées de signes extra-articulaires.
Dans la PR, les auto-Ac sont surtout des marqueurs diagnostiques et pronostiques. Le suivi évolutif repose donc surtout sur les marqueurs d'inflammation systémique (CRP, VS), l'étude des facteurs d'activité de la synoviale (cytokines...) ou des facteurs de dégradation du cartilage. La diminution des Ac anti-CCP sous traitement pourrait cependant en faire des marqueurs d'efficacité thérapeutique.

E. Traitement

- Médicaments anti-inflammatoires à effet immédiat ;
- Médicaments dits de fond qui peuvent induire une rémission complète : antimalarique de synthèse, sulfasalazine, sel d'or, D pénicillamine ;
- Immunosuppresseurs dans les formes sévères (méthotrexate) ;
- Traitements locaux utilisés sur les articulations les plus atteintes notamment anti-TNFα en intra-articulaire.

Le développement de ces nouveaux traitements immunomodulateurs nécessite d'optimiser la prise en charge et le traitement de la PR (par la recherche de marqueurs très spécifiques ou par la validation de scores composites afin de définir précocement la sévérité de la maladie).

L'essentiel de la question

Maladies auto-immunes

Multifactorielles :

- anomalies immunologiques : dysfonctionnement de la tolérance au soi ;
- gènes de susceptibilité (HLA...) ;
- facteurs environnementaux (infections...).

Deux grandes catégories : spécifique d'organe (auto-antigène présent dans un seul organe) et non spécifique d'organe (auto-antigène ubiquitaire).

Caractérisées par la production d'auto-anticorps qui ne sont pas nécessairement pathogènes mais qui sont des marqueurs indispensables pour le diagnostic, le pronostic et le suivi évolutif de ces maladies.

Polyarthrite rhumatoïde

Maladie auto-immune non spécifique d'organe appartenant au groupe des **connectivites**.

Localisation **essentiellement articulaire**. Le diagnostic basé sur les critères de l'ACR doit être **précoce** pour éviter l'apparition des lésions destructives irréversibles des articulations et le développement de manifestations systémiques.

Diagnostic clinico-radiographique et recherche d'auto-anticorps : essentiellement anti-CCP et facteurs rhumatoïdes.

Pour en savoir plus

- Arnett F.-C., Edworth S.-M., Bloch D.-A., McShane D.-J., Fries J.-F., Cooper N.-S. *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988 ; 31 : 315-24.
- Boers M., Verhoeven A.-C., van der Linden S. American College of rheumatology criteria for improvement in rheumatoid arthritis should only be calculated from scores that decrease on improvement. *Arthritis Rheum* 2001 ; 44 : 1052-5.
- Brostoff J., Scadding G.-K., Male D., Roitt I.-M. *Immunologie clinique.* De boeck université, Bruxelles, 1993.
- Homberg J.-C. *Immunologie médicale.* Estem 2001.
- Meyer O., Combe B., Elias A., Benali K., Clot J., Sany J., Eliaou J.-F. Autoantibodies predicting the outcome of rheumatoid arthritis : evaluation in two subsets of patients according to severity of radiographic damage. *Ann Rheum Dis* 1997 ; 56 : 682-5.
- Slack S.-L., Mannik M., Dale B.-A. Diagnostic value of antibodies to filaggrin in rheumatoid arth ritis. *J Rheumatol* 1998 ; 25 : 847-51.
- Ulfgren A.-K., Andersson U., Engstrom M., Klareskog L., Maini R.-N., Taylor P.-C. Systemic antitumor necrosis factor alfa therapy in rheumatoid arthritis dow regulates synovial tumor necrosis factor alpha synthesis. *Arthritis Rheum* 2000 ; 43 : 2391-6.
- Aotsuka S., Okawa-Takatsuji M., Nagatani K., Nagashio C., Kano T., Nakajima K. *et al.* A retrospective study of the fluctuation in serum levels of anticyclic citrullinated peptide antibody in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2005 ; 23 : 475-81.

Le complément et son rôle dans la réponse inflammatoire

S. CHOLLET-MARTIN
service d'immunologie biologique, hôpital Bichat, AP-HP, Paris,
et faculté de Pharmacie, Paris XI, Châtenay-Malabry.

Le système du complément est un système complexe et finement régulé, composé d'une trentaine de protéines circulantes et de récepteurs cellulaires. Sa mise en évidence date du début du xxe siècle quand Bordet, à l'Institut Pasteur, a montré que le sérum contenait des composants labiles à la chaleur, capables de lyser des bactéries, différents des anticorps. Cette activité, qui « complétait » l'action des anticorps, a donc été appelée « complément ».
Le système du complément joue un rôle clé dans la défense naturelle de l'hôte contre les différents agents infectieux et constitue à ce titre un des éléments majeurs de l'immunité innée. De plus, il participe aussi à la réponse immunitaire adaptative par son interaction avec les cellules de cette voie de l'immunité.
Trois voies d'activation différentes, la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines, aboutissent à la formation de complexes enzymatiques dont le rôle est de cliver un composant majeur de ce système, le c3. Puis, ces trois voies d'activation se rejoignent en une seule voie finale commune pour former le complexe d'attaque membranaire (CAM) lytique.
Cette fonction de lyse cellulaire, la première décrite, est loin d'être le seul effet biologique du complément. Les nombreux fragments générés au cours des cascades d'activation des différents composants ont, pour la plupart d'entre eux, un rôle important.
Les trois fonctions essentielles du complément sont : la défense anti-infectieuse, la régulation de la réponse immunitaire innée et adaptative, l'élimination des complexes immuns. De ce fait, les très nombreux types de déficit en complément décrits peuvent être associés à des infections bactériennes à répétition ou à des maladies dites à complexes immuns.

I. Les composants du complément

Les composants du complément sont des protéines et glycoprotéines synthétisées en majeure partie par les hépatocytes, mais aussi par les macrophages tissulaires, les monocytes du sang, les cellules épithéliales digestives. Les composants solubles correspondent environ à 3 g/L dans le plasma et circulent principalement sous forme inactive. Ils seront activés par clivage enzymatique, en cascade.
La nomenclature désigne les composants par des numéros (c1 à c9) ou des lettres (B, D, MBL). Les fragments formés après activation sont accompagnés de lettres minuscules. À chaque étape de la cascade d'activation, un des fragments va se lier sur la cible pour continuer la cascade, l'autre fragment, en général le plus petit, diffuse loin du site et va participer à distance à une réponse inflammatoire.
Les sites de liaison des protéines du complément activées sont très labiles et instables. Cette cascade doit donc être parfaitement orchestrée et rapide. Les fragments activés, doués d'une activité enzymatique, sont rapidement inactivés s'ils ne trouvent pas leurs substrats. La demi-vie de ces substrats est très courte, de l'ordre de un jour, témoignant d'une consommation permanente.
Les protéines c2, c4 et B sont codées dans le complexe majeur d'histocompatibilité de type III. Il existe un grand polymorphisme allélique pour la plupart des composants du complément.
Les propriétés des différents fragments sont résumées dans le *tableau 1*.

Tableau 1. Propriétés des composants du complément et de leurs produits de clivage

Composant natif	Produit de clivage	Propriétés
C1		C1q fixation FcIgG/IgM C1r active c1s C1s active c4 et c2
C4	C4a C4b	Anaphylatoxine Se lie à C2
C2	C2a C2b	Forme la c3 convertase classique Inconnue
C3	C3a C3b	Anaphylatoxine Se lie à la c3 convertase classique Opsonine Se lie à B
Facteur B	Ba Bb	Inconnue Forme la c3 convertase alterne
Facteur D		Clive B
Properdine		Stabilise c3 convertase alterne
C5	C5a C5b	Chimio-attractant, anaphylatoxine Se lie à c6
C6		Se lie à c7
C7		Permet l'insertion membranaire
C8		Se lie à plusieurs c9
C9		Polymérisation, création du pore
MBL		Liaison à des mannoses
MASP1 et 2		Sérine estérase, se lie à MBL

II. Les trois modes d'activation du complément

L'activation initiale du complément peut être réalisée grâce à trois voies différentes, indépendantes, rendant compte de la capacité de l'organisme à répondre rapidement à une agression. Ces trois voies visent à former du c5b qui conduit à la lyse de la cellule-cible.

A. La voie classique d'activation du complément

C'est la première décrite, historiquement. Elle nécessite la présence de complexes antigène-anticorps, soit solubles, soit particulaires (par exemple, un anticorps à la surface d'une bactérie). Les IgM, les IgG1, les IgG2 et les IgG3 humaines peuvent activer le c1. Le c1 est un complexe macromoléculaire comprenant une molécule de c1q, deux molécules de c1r et deux molécules de c1s (c1qr2s2). Le c1q a une structure en tige avec 6 têtes globulaires ; le c1r et le c1s s'entourent autour du c1q en

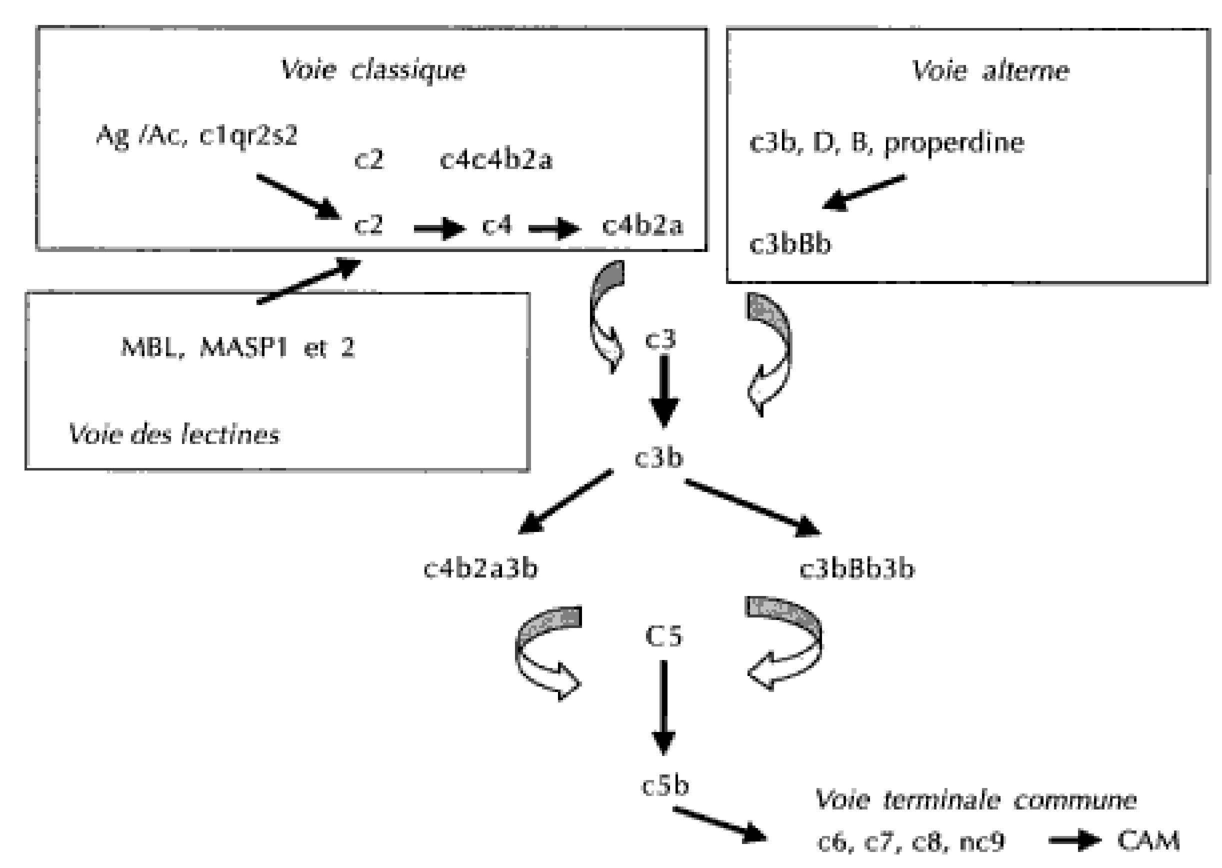


Figure 1. Les 3 voies d'activation du complément : vue d'ensemble

forme de huit. Chaque c1q se fixe à 2 fragments Fc de 2 IgG distantes de 30 à 40 nm l'une de l'autre (*fig.* 2).

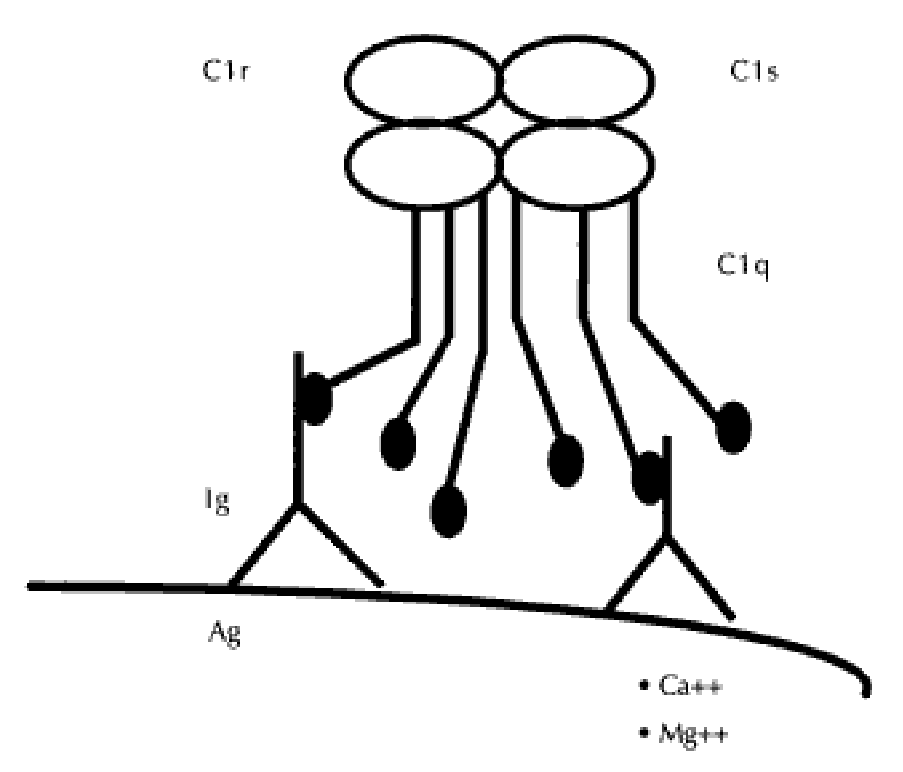


Figure 2. Initiation de l'activation de la voie classique

Cette fixation induit l'activité sérine estérase du c1r qui induit à son tour l'activité enzymatique du c1s. Ce dernier possède 2 substrats, le c4 et le c2 (*fig. 3*).

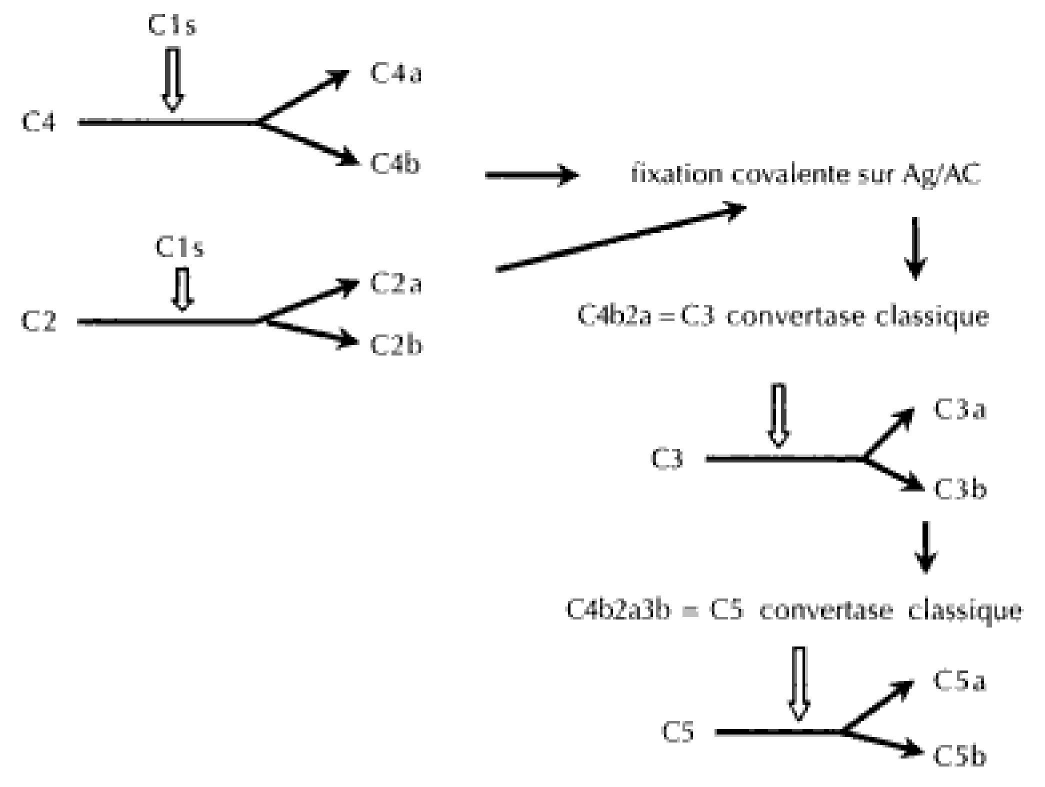


Figure 3. Formation des c3 et c5 convertases classiques

Le c1s hydrolyse le c4 en c4a, une anaphylatoxine médiatrice de l'inflammation, et en c4b qui s'attache sur la cible au voisinage du c1. Le c2 se fixe alors sur le c4b, et se trouve clivé lui aussi par le c1s. Le petit fragment c2b est éliminé et le complexe formé c4b2a, stable sur la cible, est appelé c3 convertase de la voie classique. Une seule molécule de cette enzyme est capable de cliver plus de 200 molécules de c3 pour former du c3a, anaphylatoxine qui diffuse loin de la cible, et du c3b. Ce c3b peut se fixer sur la c3 convertase pour former un gros complexe c3b4b2a, appelé c5 convertase de la voie classique. Cette dernière enzyme clive le c5 en c5a, anaphylatoxine, et en c5b qui peut fixer le c6 et initier, de ce fait, la formation du CAM.
D'autre part, certaines molécules de c3b formées vont diffuser pour aller recouvrir des antigènes et se comporter comme une opsonine.

B. La voie alterne d'activation du complément

Cette voie ne nécessite pas de complexe antigène-anticorps pour être activée, contrairement à la voie classique, et représente donc un élément essentiel de l'immunité innée, un système en veille permanente contre l'agression bactérienne. Pour des raisons encore mal connues, le c3 natif peut être hydrolysé spontanément en c3a et c3b au niveau d'une liaison thioester. Parmi les substances capables de fixer le c3b directement, on peut citer les parois de certaines bactéries Gram négatives, Gram positives, levures, ou certaines enveloppes de virus. Le c3b fixé va se lier à

la protéine B, permettant le clivage de B par la protéine D, enzymatiquement active. La protéine D va donc cliver B lié au c3b en libérant d'une part Ba qui diffuse, et en formant c3bBb lié à la cible. Il s'agit de la c3 convertase de la voie alterne, de demi-vie très courte si elle n'est pas stabilisée par la properdine.
Cette c3 convertase c3bBb est capable de générer beaucoup de molécules de c3b, induisant donc une boucle d'amplification intense dont le but est de déposer sur la cible un grand nombre de molécules de c3b.
De plus, du c3b peut se fixer sur la c3 convertase, induisant une enzyme nouvelle à activité c5 convertase (*fig. 4*).

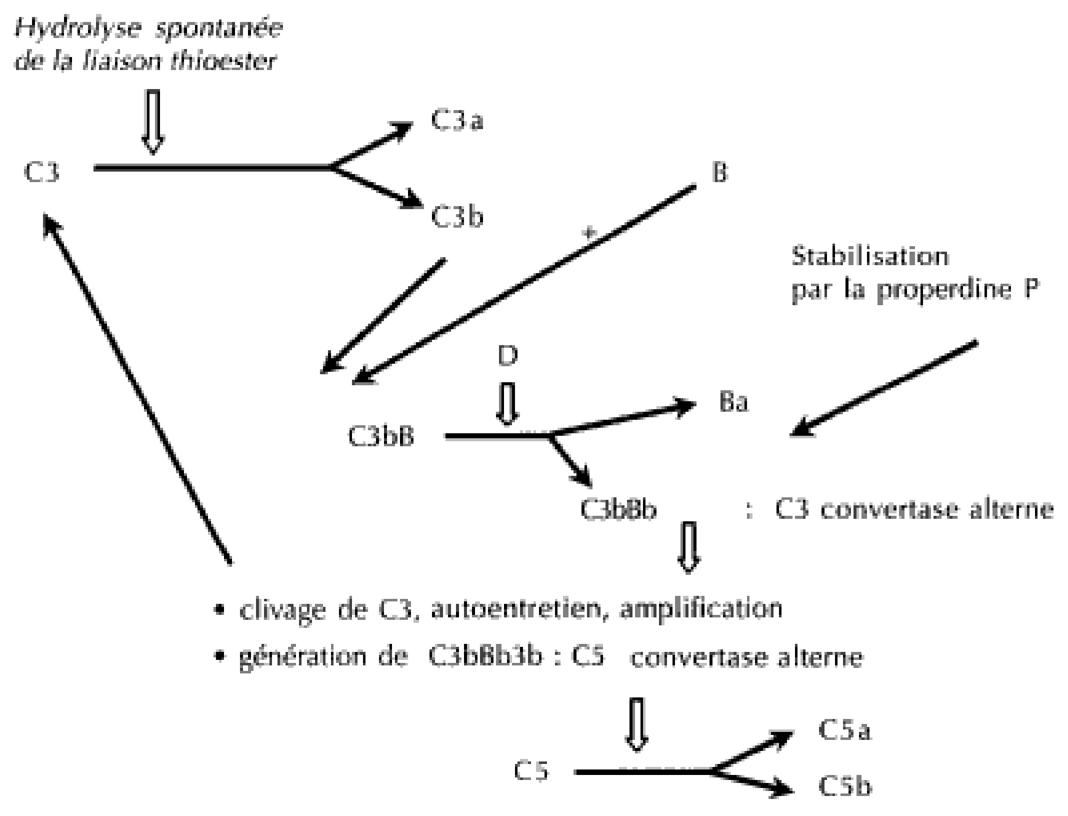


Figure 4. Boucle d'amplification de la formation de c3b par la voie alterne

C. La voie des lectines d'activation du complément

Cette voie a été mise en évidence plus récemment. Elle comprend une protéine de reconnaissance, la MBL (*mannose binding lectin*) et deux sérines estérases (MASP1 et MASP2 : MBL *associated serine esterase*).
Elle ne dépend pas, comme la voie alterne, de la présence d'un anticorps. La MBL appartient à la famille des collectines, possédant une région collagène et un domaine lectine. Elle est produite au cours de la réponse inflammatoire ; sa structure est proche de celle du c1q, alors que les MASP1 et 2 sont proches de c1r et c1s.
La voie des lectines est activée par la fixation, d'abord de la MBL sur des résidus mannose à la surface des micro-organismes, puis des MASP1 et 2. Cette association entraîne le clivage du c4 puis du c2, rejoignant ensuite la voie classique de formation de la c3 et de la c5 convertase.

III. La voie terminale commune : formation du complexe d'attaque membranaire, le CAM

Cette voie commune met en jeu les composants c5b, c6, c7, c8 et c9 qui vont interagir pour former le CAM, structure macromoléculaire responsable de la destruction cellulaire.
La c5 convertase, générée par une des trois voies d'activation, produit du c5b lié à la surface de la cellule-cible, fournissant un site d'ancrage très labile pour les composants du CAM. Lorsque le c6, puis le c7, se fixent sur le c5b, se crée un complexe qui exprime un site hydrophobe d'insertion dans la double couche phospholipidique membranaire.
Puis, le c8 se lie à ce complexe, créant un petit pore de 10 A° de diamètre. Enfin, 10 à 15 molécules de c9 se fixent, se polymérisent et s'insèrent également dans la membrane.
Le CAM complet ainsi créé possède une forme tubulaire, dont le pore a un diamètre d'environ 100 A°. Les ions et les petites molécules peuvent diffuser librement à travers le canal central, modifiant intensément l'équilibre osmotique de la cellule et donc la tuant par un influx d'eau et une perte des électrolytes. Les bactéries et les virus sont facilement lysés par le CAM ; les cellules nucléées, en particulier tumorales, sont assez résistantes du fait de la présence d'une protéine régulatrice à la surface de leur membrane, le CD59 (*homologous restriction factor*, HRF).

IV. Les protéines régulatrices du complément

Une régulation fine et élaborée est indispensable pour éviter l'auto-entretien et l'hyper consommation des protéines du complément qui induiraient la destruction de cibles inappropriées comme les cellules de l'hôte. Le mécanisme général d'activation du complément constitue en soi un mécanisme de régulation.
En effet, de nombreuses protéines, dans les trois voies d'activation, sont labiles, fragiles, inactivables spontanément dès lors qu'elles sont loin d'une cible, ou du composant de la cascade avec lequel elles doivent interagir.
De plus, de nombreuses protéines régulatrices existent, inhibant plus ou moins spécifiquement différentes protéines du complément. Certaines de ces protéines sont solubles, d'autres membranaires. Elles sont ici décrites dans l'ordre chronologique de leurs interactions *(tab. 2)*.
La protéine soluble inhibitrice du c1 (c1 inhibiteur) forme un complexe avec c1r2s2, l'obligeant à se dissocier du c1q, le rendant donc incapable d'activer c4 ou c2. Les protéines régulant les trois c3 convertases sont essentielles car la molécule c3b est biologiquement active, capable à la fois de la génération de CAM, et d'opsonisation de cellule saine ou altérée.
Un premier mécanisme de régulation du c3b vient de son hydrolyse spontanée dès qu'il s'éloigne des c3 convertases. D'autre part, il existe une famille de protéines apparentées régulatrices des c3 convertases codées sur le chromosome 1, dans une région appelée RCA (*regulatory complement activation genes*).

Tableau 2. Protéines régulatrices du complément

Protéine	Type	Voie	Propriétés
C1 inhibiteur	Soluble	Classique	Dissocie le c1r2s2
C4BP	Soluble	Classique Lectines	Se lie au c4b, cofacteur de I
Facteur H	Soluble	Alterne	Se lie au c3b, cofacteur de I
CR1, MCP	Membranaire	Classique, alterne et lectines	Se lie au c3b ou c4b, cofacteur de I
DAF	Membranaire	Classique, alterne et lectines	Accélère la dissociation des c3 convertases
Facteur I	Soluble	Classique, alterne et lectines	Clive c3b ou c4b, sérine estérase
Vitronectine	Soluble	Terminale	Prévient l'insertion du c5b67 dans la membrane
HRF	Membranaire	Terminale	Se lie au c5b678, empêche la fixation du c9

La protéine soluble c4BP (protéine de liaison du c4) et 2 protéines membranaires, le récepteur du complément de type 1 (CR1 ou CD35) et le cofacteur protéique membranaire (MCP ou CD46), se lient au c4b et empêchent sa fixation au c2a. Une autre protéine intervient alors, le facteur I qui clive c4b en c4c et c4d.
Dans la voie alterne, le CR1, le MCP ou un autre composant appelé facteur H se lie au c3b et empêche la fixation au facteur B ; le facteur I peut alors cliver c3b en fragments inactifs (ic3b, c3f, c3c, c3dg).
D'autres protéines codées dans la région RCA peuvent dissocier la c3 convertase déjà assemblée, en particulier le facteur accélérant la dissociation (DAF ou CD55). Là encore, le facteur I interviendra ensuite pour cliver les composants issus de la dissociation et inactiver définitivement la c3 convertase.
En ce qui concerne la voie terminale, une protéine soluble, la vitronectine, peut se lier au c5b67 et empêcher son insertion définitive dans la membrane de cellules voisines de la cible.
Pour terminer, il faut citer le facteur de restriction homologue (HRF ou CD59) qui protège les cellules d'une lyse non spécifique en se liant au c8 et prévenant ainsi l'assemblage des c9, à condition que complément et cible soient de la même espèce.

V. Effets biologiques du complément

Le rôle principal du complément est probablement lié à sa participation à la réponse anti-infectieuse par sa capacité de lyse rapide et non spécifique des bactéries et virus. Cependant, son rôle dans l'immunité innée est également en rapport avec les nombreux produits de clivage des protéines du complément, dont les propriétés chimio-attractantes ou opsonisantes par exemple sont essentielles à la réponse inflammatoire. De plus, les interactions des protéines du complément ou leurs récepteurs avec plusieurs éléments de la réponse immunitaire spécifique font que ce système

assure une interface efficace entre réponse innée et réponse spécifique. Le *tableau 3* résume les différents récepteurs pour les fragments de clivage du complément.

Tableau 3. Récepteurs pour les fragments de clivage du C3, C4, C5

Récepteur	Ligand	Distribution cellulaire	Propriétés
CR1 = CD35	C3b, C4b	GR, PN, monocytes LyB, PE	Bloque formation C3 conv Lie les CI aux cellules
CR2 = CD21	C3dg, C3d, C3bi	LyB, LyT	Partie du corécepteur des LyB (BCR)
CR3 = CD11/CD18	C3bi	PN, monocytes, macrophages	Adhérence et migration transendothéliale
Récepteurs du C3a, C4a, C5a	C3a, C4a, C5a	Mastocytes, basophiles, PN, monocytes, plaquettes	Induit la dégranulation

A. Destruction directe des cellules et des micro-organismes par le CAM

Le CAM peut lyser de nombreux micro-organismes et cellules nucléées. La voie alterne et la voie des lectines permettent de déclencher ce système rapidement, en l'absence de toute interaction antigène-anticorps. L'activation par la voie classique, grâce au complexe antigène-anticorps, vient en second lieu afin de compléter cette réponse innée, naturelle.

Tous les virus enveloppés sont sensibles à la lyse par le complément ; on peut citer par exemple les *Rotavirus* et les *Herpes virus*. Beaucoup de bactéries Gram négatives peuvent être lysées par le complément ; cependant, certaines ont su développer un système de résistance, comme les *Escherichia coli* de phénotype lisse, ou certaines *Neisseria*.

Les bactéries Gram-positives sont en général résistantes, en raison de la couche épaisse de peptidoglycanes de leur paroi. Enfin, certains micro-organismes contiennent des protéines naturellement régulatrices du complément, mimant les effets de la c4BP, du CR1 ou de DAF, par exemple.

Les cellules nucléées sont assez résistantes à la lyse médiée par le complément, en particulier les cellules tumorales. En effet, ces cellules peuvent endocyter le CAM nouvellement formé et réparer les lésions cellulaires rapidement pour restaurer l'équilibre osmotique.

B. Rôle des produits d'activation du complément dans la réponse inflammatoire et l'immunité innée

De nombreux fragments issus de l'activation du complément jouent un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire.

- Les petits peptides c3a, c4a et c5a sont des anaphylatoxines : ils se lient à leurs récepteurs à la surface des basophiles et mastocytes, induisant la dégranulation de substances actives comme l'histamine. Une protéase, la N carboxypeptidase, clive l'arginine de ces trois anaphylatoxines et régule de ce fait leur activation ;
- Le c3a et le c5a sont des chimio-attractants : ils sont capables d'induire le déplacement des monocytes et polynucléaires neutrophiles du sang circulant vers les tissus grâce à leur passage transendothélial. Le c5a est considéré comme la substance chimio-attractante la plus puissante de l'organisme, avec certaines chimiokines

comme l'IL-8. Un autre élément du système du complément est en charge de cette migration des neutrophiles vers les foyers inflammatoires : il s'agit du récepteur pour le c3bi, le CR3 qui correspond en fait à la β2 intégrine CD11b/CD18, molécule d'adhérence exprimée fortement par les neutrophiles. L'interaction entre le CR3 du neutrophile et l'ICAM1 de la cellule endothéliale est nécessaire à l'adhérence du neutrophile, préalable indispensable à sa migration (*fig. 5*).

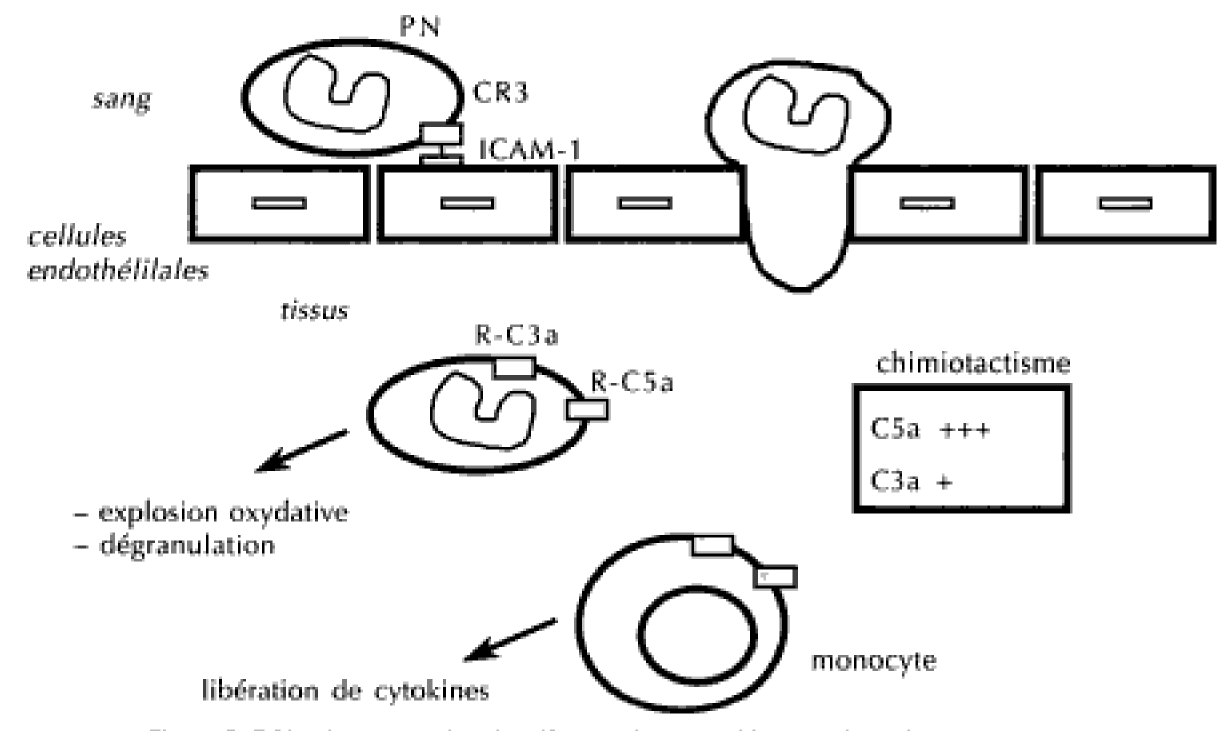


Figure 5. Rôle des produits de clivage du complément dans le mouvement, l'adhérence et le passage transendothélial des PN

D'autres fragments sont des opsonines : il s'agit du c3b essentiellement, le c4b étant aussi faiblement opsonisant. L'intense activité des c3 convertases conduit au recouvrement des cibles par des molécules de c3b : c'est le phénomène d'opsonisation. Les cellules phagocytaires exprimant des récepteurs pour le c3b (CR1), celles-ci vont fixer facilement les cibles opsonisées et les phagocyter (*fig. 6*).

C. Interactions avec la réponse immunitaire adaptative

Plusieurs arguments permettent maintenant de situer le système du complément à l'interface entre réponse immunitaire innée et réponse immunitaire adaptative.

- Le récepteur à l'antigène sur les lymphocytes B (BCR) ne peut fonctionner de manière optimale qu'avec l'intervention de certains corécepteurs. En particulier, le CR2 est un corécepteur important du BCR, permettant de diminuer fortement la quantité d'antigène nécessaire à l'activation du BCR et donc à la production ultérieure des anticorps ;
- Un certain nombre de cellules présentatrices d'antigène, comme les cellules dendritiques, expriment les CR1, CR2 et CR3 permettant aux antigènes recouverts des produits du complément d'être beaucoup plus captifs des cellules dendritiques, augmentant donc leur chance de rencontrer les lymphocytes T spécifiques de ces antigènes.

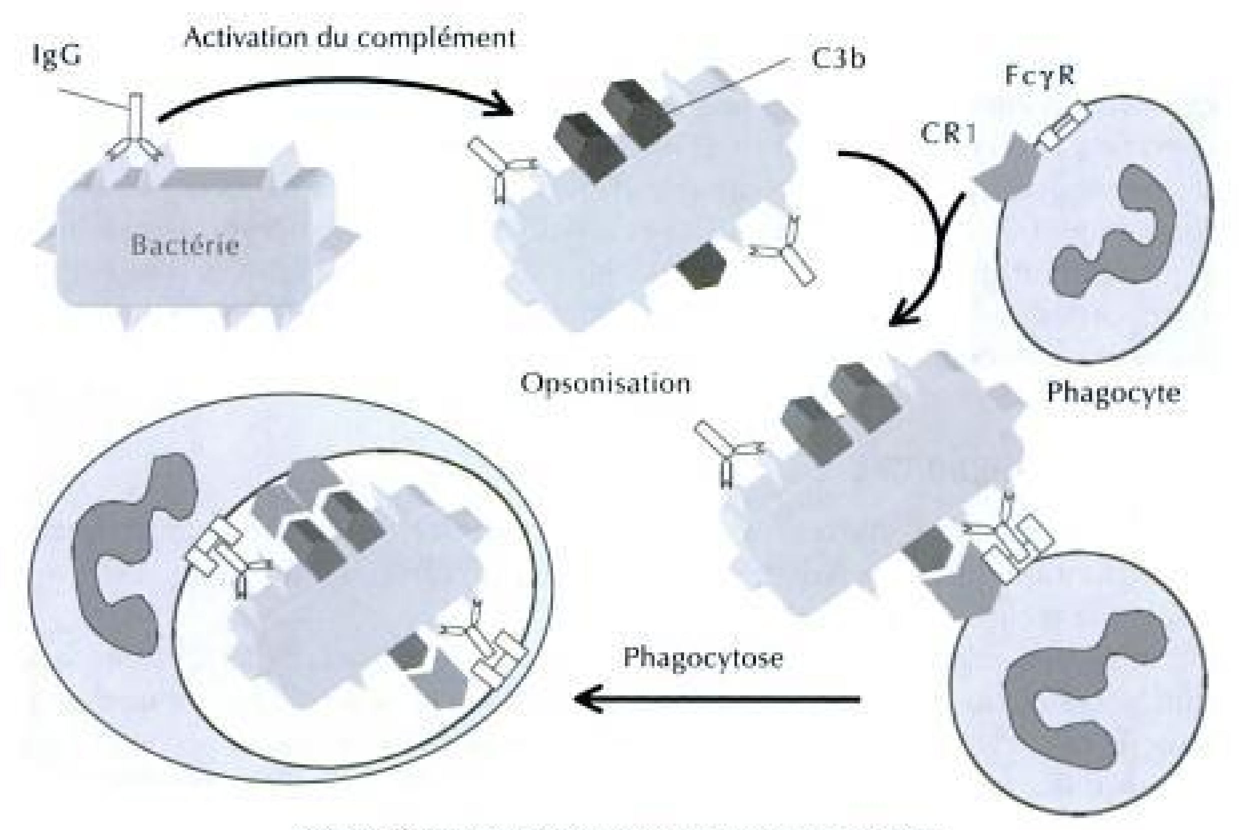


Figure 6. Opsonisation et phagocytose des bactéries

D. Transport et élimination des complexes immuns

La propriété générale que possède le c3b de se fixer sur les antigènes au sein d'un complexe immun lui permet de fixer ce complexe sur les cellules possédant un CR1. En particulier, les nombreuses hématies du sang peuvent ainsi véhiculer les complexes immuns vers le foie et la rate où ils seront alors phagocytés par les macrophages tissulaires. Les cellules apoptotiques recouvertes de c3b sont aussi éliminées de cette façon de la circulation et des tissus.
Au cours du lupus, on observe des déficits plus ou moins profonds en c1, c2 et c4 qui contribuent à réduire les quantités de c3b produites. Insuffisamment éliminés, ils se déposent dans les tissus et induisent des lésions en particulier rénales.

VI. Méthodes d'exploration du complément

L'exploration biologique du système du complément est délicate. Les résultats sont le reflet d'un équilibre entre production et consommation. L'étude d'une hypocomplémentémie cherche à mettre en évidence soit une consommation excessive, soit un déficit héréditaire complet ou partiel. Les protéines du complément étant fragiles, la qualité du prélèvement (tube avec EDTA), du transport (rapide à 4 °C) et de la conservation (congelé à – 80 °C) est essentielle. L'exploration fait appel à la fois à des dosages antigéniques, et à des dosages fonctionnels.

A. Dosage fonctionnel : « le complément hémolytique 50 (CH50) »

L'exploration globale de la voie classique et de la voie terminale du complément se fait grâce à la technique dite du CH50 ; elle correspond à la détermination de la plus petite quantité de plasma capable d'entraîner la lyse de 50 % d'un nombre donné de globules rouges de mouton sensibilisés par des anticorps antiglobules rouges de mouton. La quantité d'hémoglobine libérée par les globules rouges lysés est proportionnelle à la quantité de complément présent dans le plasma. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'un pool de plasma normaux.

B. Dosage antigénique

Chacune des protéines du complément peut être dosée par méthode immunochimique (immunodiffusion radiale ou néphélémétrie, Elisa). La sensibilité est variable selon la technique.
L'interprétation tient compte à la fois des dosages antigéniques, et des dosages fonctionnels. Les bilans de dépistage comprennent en général le CH50 fonctionnel et un dosage de c3 et c4 antigénique. Les autres protéines sont dosées dans un second temps, en cas de difficulté d'interprétation et de suspicion de déficit acquis ou héréditaire.
En cas de suspicion d'œdème angioneurotique, le dosage du c1 inhibiteur est effectué à la fois par méthode néphélémétrique, et par méthode fonctionnelle ; ce dosage peut constituer une urgence diagnostique.
Selon les résultats, des dosages supplémentaires sont proposés tels que la recherche d'autoanticorps anti-c1 inhibiteur.

C. Autres explorations

L'activité fonctionnelle spécifique de chaque composant peut être explorée par méthode hémolytique spécifique, grâce aux globules rouges de mouton et à des plasmas calibrés en chacun des composants.
La recherche d'autoanticorps anti-c1q, anti-c1 inhibiteur et anti-c3 convertase alterne se fait par Elisa. Les récepteurs du complément (CR1, CR2, CR3) et les protéines régulatrices membranaires sont quantifiés par cytométrie en flux grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques. La mise en évidence des nombreux variants alléliques du c4 et du c2 est réalisée par western-blot, ce qui permet de faire la différence entre un simple variant dû à l'extrême polymorphisme naturel de ces gènes et un variant à l'origine d'une maladie. L'étude génotypique sera alors menée dans un laboratoire spécialisé afin de faire la preuve de la responsabilité de l'anomalie décrite. L'étude familiale doit être complète, les modes de transmission étant variables selon les déficits.

VII. Anomalies du système du complément

L'exploration biologique du complément est généralement mise en œuvre au cours de maladies auto-immunes, de glomérulopathies ou d'infections bactériennes sévères à répétition.

L'augmentation des valeurs du CH50 est en général le reflet d'un syndrome inflammatoire, par augmentation de synthèse hépatique des différentes protéines du complément, dans le cadre d'une augmentation plus large des protéines de la phase aiguë. Ce cadre ne justifie en général pas d'exploration plus poussée ; cependant, des études récentes semblent mettre en avant un rôle important pour le c5a dans la physiopathologie du sepsis sévère, proposant un monitorage précis et une inhibition spécifique.
En revanche, une hypocomplémentémie est le témoin, soit d'une activation de la voie classique et/ou alterne (consommation), soit d'un déficit héréditaire en une protéine du complément. L'exploration fine décrite ci-dessus permet de faire ces diagnostics.

A. Consommation des protéines du complément : déficits acquis

Une diminution du CH50, associée à une baisse de c3, de c2 et de c4, en l'absence d'insuffisance hépatique et de syndrome néphrotique, signe une activation de la voie classique ; le c1q peut être normal. Le retour à la normale après la phase de consommation aiguë ou subaiguë se fera séquentiellement avec des tableaux biologiques difficiles à interpréter.
Ce tableau est typique des maladies à complexes immuns au premier rang desquelles se situe le lupus érythémateux disséminé (LED). L'intensité d'activation de la voie classique est un critère de gravité des LED en poussée. Un autoanticorps anti-c1q est fréquemment observé, associé à un déficit plus ou moins sévère en c4 ou c2 discuté dans le chapitre sur les déficits immunitaires.
Sur le plan méthodologique, la présence d'immuns complexes circulants et/ou de cryoglobuline peut entraîner une activation artéfactuelle *in vitro* dans le tube de prélèvement de la voie classique, compliquant l'interprétation. Dans certaines glomérulonéphrites membranoprolifératives, un anticorps anti-c3 convertase alterne (c3Nef) est retrouvé, entraînant une consommation accrue du c3.
La consommation par la voie alterne se traduit par une diminution des concentrations en c3 et parfois du facteur B ; le CH50, le c2 et le c4 restent normaux. La plupart du temps, cela est observé dans le cadre d'un sepsis sévère. Cela peut aussi être en rapport avec un anticorps de type c3Nef, ou un déficit en H ou I.
Enfin, des hypocomplémentémies acquises ont été décrites dans de nombreuses autres pathologies auto-immunes ou non comme l'infarctus du myocarde, la malnutrition, les vascularites, la drépanocytose…

B. Déficits congénitaux en protéines du complément

Ces déficits héréditaires sont en général associés à des infections bactériennes à répétition ou à des maladies auto-immunes à complexes immuns. Le chapitre du présent ouvrage consacré aux déficits immunitaires congénitaux comprend un paragraphe consacré aux déficits en composants du complément. Le lecteur est donc invité à s'y reporter.

L'essentiel de la question

Le système du complément est constitué d'un ensemble de protéines solubles et membranaires qui jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire innée, mais aussi dans la réponse spécifique.
Certaines de ces protéines sont effectrices, d'autres régulatrices. La plupart existent à l'état natif, sous forme inactive, et sont ensuite activées enzymatiquement en cascade. Trois voies d'activation, parallèles, indépendantes, permettent la formation d'un complexe d'attaque membranaire capable de lyser les cellules et les micro-organismes.
La voie classique est déclenchée par les complexes antigènes-anticorps, la voie alterne par les surfaces des micro-organismes, la voie des lectines par les résidus mannose des surfaces microbiennes.
Ces trois voies vont produire des complexes enzymatiques, les c3 convertases capables d'activer le c3 en c3b, composant clé du système du complément.
À partir du c3b, des c5 convertases seront générées, permettant la création du complexe lytique par ajout successif des composants terminaux. En dehors de cette fonction lytique, les différentes protéines du complément jouent un rôle dans la réponse inflammatoire grâce aux produits de clivage des protéines natives. Par exemple, le c5a est un chimio-attractant puissant, le c3b est une opsonine, le c3a est une anaphylatoxine, le récepteur pour le c3bi est une molécule d'adhérence indispensable pour la migration transendothéliale des phagocytes.
Mais le complément est également impliqué dans l'immunité spécifique, via par exemple le récepteur pour le c3d, partie intégrante du BCR, et le récepteur pour le c3b en charge de l'élimination des complexes immuns. En cas de pathologies auto-immunes, un déficit par consommation est fréquemment observé ; des déficits héréditaires de plus en plus nombreux de composants sont décrits, prédisposant à des infections bactériennes sévères à répétition, ou à certaines maladies auto-immunes comme le lupus. L'exploration biologique du complément est délicate ; elle comprend, en parallèle, des dosages fonctionnels et des dosages antigéniques.

Pour en savoir plus

- Walport M.-J. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001 ; 344 : 1058-66.
- Walport M.-J. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001 ; 344 : 1140-44.
- Fremeaux-Bacchi V., Dragon-Durey M.-A., Blouin J., Mouthon L., Fridman W.-H. Le complément en médecine interne. *Med Interne* 2003 ; 154 : 529-40.
- Dragon-Durey MA, Fremeaux-Bacchi V. Déficits en protéines du complément en pathologie humaine. *Presse Med* 2006 ; 35 : 861-70.
- Mercier J.-C., Bingen E., Schlegel N., Elion J., Casanova J.-L., Mira J.-P., Beaufils F. *Purpura fulminans* méningococcique : rencontre malheureuse de polymorphismes génétiques. *Arch Pediatr* 2001 ; 8 : 843-52.
- Sturfelt G. The complement system in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2002 ; 31 : 129-32.
- Hawlisch H., Kohl J. Complement and Toll-like receptors : key regulators of adaptive immune responses. *Mole Immunol* 2007 ; 43 : 13-21.
- Barilla-Labarca M.-L., Atkinson J.-P. Rheumatic syndromes associated with complement deficiency. *Curr Opin Rheumatol* 2003 ; 15 : 55-60.
- Bouillet L., Ponard D., Drouet C., Massot C. Angiœdèmes non allergiques. *Rev Med Intern* 2002 ; 23 : 533-41.
- Schmidt B.-Z., Colten H.-R. Complement : a critical test of its biological importance. *Immunol Rev* 2000 ; 178 : 166-76.

Déficits immunitaires congénitaux

S. GROOTENBOER-MIGNOT, Service d'immunologie biologique, hôpital Bichat, AP-HP, Paris ;
S. CHOLLET-MARTIN, Service d'immunologie biologique, hôpital Bichat, AP-HP, Paris et faculté de Pharmacie, Paris XI, Châtenay-Malabry.

I. Généralités

A. Circonstances de découverte

Les déficits immunitaires primitifs (DIP) reflètent des anomalies apparues dans le développement et la maturation des cellules du système immunitaire. Ce sont des maladies rares (environ 1/5 000 naissances) pour lesquelles plus d'une centaine de syndromes différents ont déjà été répertoriés. De ces défauts résulte le plus souvent une augmentation de la sensibilité aux infections.
La plupart de ces défauts affectent la lignée lymphoïde (cellules B et T, déficit de l'immunité humorale ou cellulaire) ou dans la lignée myéloïde, la fonction phagocytaire. Enfin, de rares cas concernent la voie du complément (*tab. 1*). Les anomalies décrites ont permis d'expliquer un grand nombre de mécanismes immunologiques. Nous ne traiterons ici que les principaux.

Tableau 1. Manifestations associées à un type de déficit immunitaire

	Fréquence	Germes	Manifestations
Déficit de l'immunité cellulaire	70 %	Germes opportunistes ou intracellulaires *Pneumocystis carinii*, Candida	Retard de croissance, Auto-immunité, lymphome, diarrhées chroniques
Déficit de l'immunité humorale	20 %	Pyogènes extracellulaires	Atteintes respiratoire, ORL, digestive, diarrhées
Déficit de cellules phagocytaires	10 %	Pyogènes, Candida, *Aspergillus*	Granulomes, chute tardive du cordon, atteintes peau, poumons, gencives
Déficit en complément	< 1 %	Neisseria	Infections bactériennes récurrentes

Les conséquences cliniques des DIP dépendent du nombre et du type de composants du système immunitaire impliqués. Des défauts apparaissant tôt dans le schéma du développement de l'hématopoïèse affectent l'ensemble du système immunitaire c'est le cas par exemple de la dysgénésie réticulaire (*fig. 1*).
La famille de maladies appelée immunodéficience combinée sévère (DICS) trouve son origine dans des défauts du développement lymphoïde qui affectent soit les cellules T, soit à la fois les cellules T et les cellules B. Alors que les défauts du système à médiation cellulaire sont associés à une sensibilité accrue aux infections par les virus, les protozoaires, les champignons et les pathogènes intracellulaires (*Candida albicans, Pneumocystis carinii, Mycobacterium*), les défauts du système humoral sont essentiellement associés à des infections par des bactéries encapsulées. Dans le cas d'un déficit de la fonction phagocytaire, le tableau clinique est plus limité aux infections bactériennes. Des défauts plus différenciés du système immunitaire ont des conséquences habituellement moins graves : par exemple, un déficit sélectif en IgA n'affecte que par une plus grande sensibilité aux infections des tractus respiratoire et génito-urinaire.
La *figure* 2 illustre la localisation des défauts qui donnent naissance à des DIP, au cours du développement cellulaire dans le système immunitaire. Le *tableau* 2 fait le point sur les signes cliniques évocateurs d'un déficit immunitaire primitif.

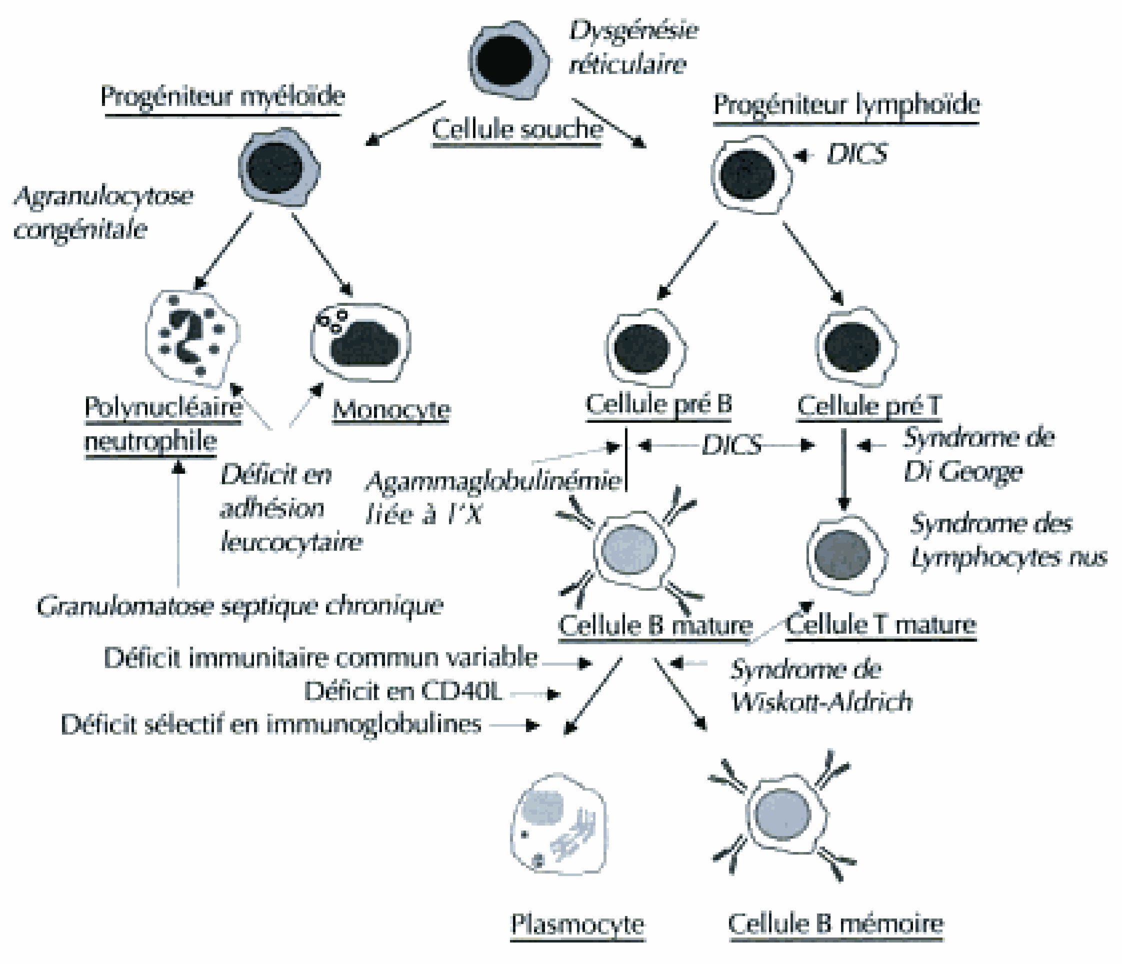


Figure 1. Déficits immunitaires primitifs au cours de l'hématopoïèse

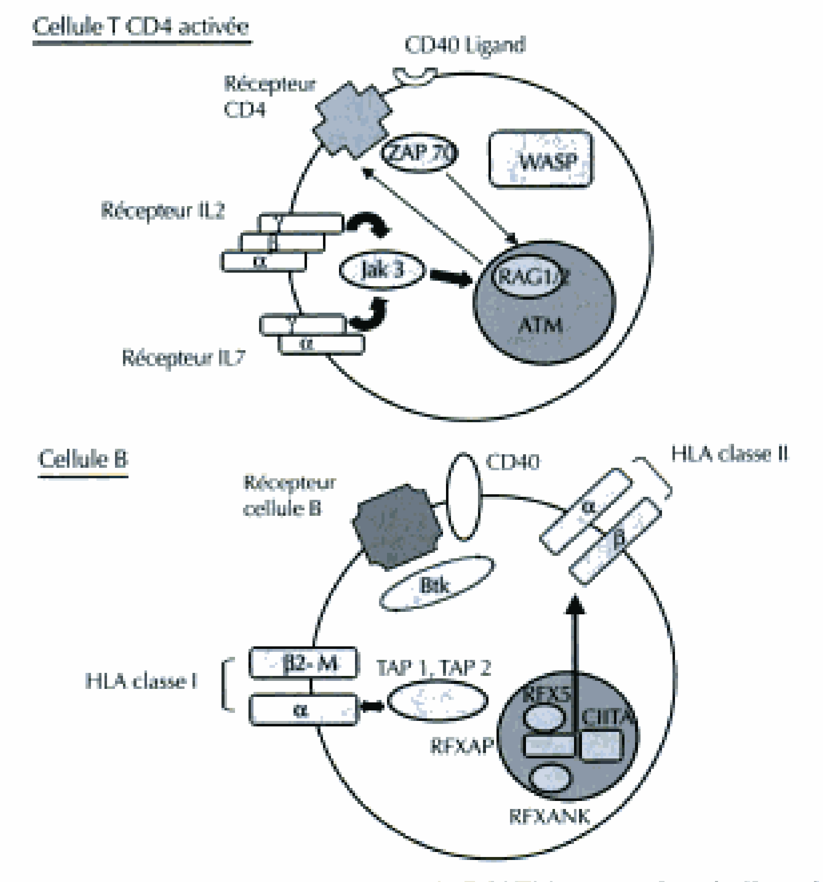


Figure 2. Localisation des gènes anormaux dans les DIP [ATM : mutation de l'ataxie télangiectasie]

Tableau 2. Signes cliniques associés à un DIP

• Épisodes répétés d'infections ORL ou pulmonaires : – 8 otites par an chez l'enfant – 2 sinusites par an chez l'enfant – 2 pneumopathies par an chez l'enfant ou l'adulte. • Plus de 2 épisodes d'infections sévères • Infections virales répétées ou chroniques (herpès, zona, verrues) • Nécessité d'un traitement antibiotique cumulé prolongé (> 2 mois par an) • Dissémination d'un vaccin vivant	• Épisodes de fièvres importantes inexpliquées • Mycose cutanéo-muqueuse persistante après l'âge de 1 an • Diarrhées chroniques rebelles au traitement • Retentissement sur la croissance ou l'état nutritionnel • Manifestations auto-immunes • Granulomatose généralisée • Dilatation des bronches • Cas d'immunodéficiences connues dans la famille

B. Stratégie diagnostique

Devant un tableau clinique évocateur d'un DIP, la recherche diagnostique comprend en première intention la numération formule sanguine (NFS). Une lymphopénie orientera vers un déficit de l'immunité cellulaire. Chez le jeune enfant, le chiffre des lymphocytes doit être interprété en fonction de l'âge car une lymphocytose peut être physiologique. Une anémie, une thrombopénie ou une neutropénie retrouvée dans ce contexte peuvent être évocatrices d'une maladie auto-immune associée, complication fréquente de ces déficits. Une neutropénie peut être au premier plan, cependant, seule celle inférieure à 500 neutrophiles/mm^3 est responsable de signes cliniques patents. Un nombre normal de neutrophiles n'exclut pas une neutropénie cyclique qui, pour être mise en évidence, nécessite des numérations successives à quelques jours d'intervalle.

Un dosage pondéral des immunoglobulines (IgA, IgG, IgM) par néphélémétrie peut également être demandé en cas de suspicion de déficit de l'immunité humorale. Il peut mettre en évidence une absence totale d'Ig (agammaglobulinémie), une diminution (hypogammaglobulinémie) ou un défaut sélectif d'une sous-classe. Cependant, il est difficile à interpréter avant l'âge de 3 mois à cause de la présence des immunoglobulines d'origine maternelle, et des faibles taux d'IgA et d'IgM chez le nourrisson à l'état physiologique.

Une numération et un phénotypage des lymphocytes circulants peuvent être réalisés par cytométrie en flux grâce à un marqueur fluorescent des *clusters* de différenciation, les CD, (CD3, CD4 et CD8 pour les lymphocytes T ; CD19, CD20 pour les lymphocytes B ; CD16 ou CD56 pour les lymphocytes *natural killer*). Les *tableaux 3, 4* et *5* illustrent l'utilité de ces examens dans l'orientation diagnostique vers les principaux déficits immunitaires de la lignée lymphoïde.

En dehors des neutropénies, le diagnostic des déficits des cellules phagocytaires nécessite une étude fonctionnelle des polynucléaires. Les fonctions de ces derniers incluent le mouvement, l'adhérence, l'endocytose et la destruction des particules ingérées. Le mouvement et l'adhérence sont testés par l'étude du chimiotactisme spontané et en présence de substances chimio-attractantes comme le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanie (FMLP) ou le C5a.

La production des formes réactives de l'oxygène (FRO) est testée de 3 manières différentes : mesure directe d'anions superoxydes et des FRO par réduction de cytochrome c, chimioluminescence (mesure de l'énergie lumineuse émise par les polynucléaires après amplification par le luminol), et test de réduction du nitro-bleu-tétrazolium (NBT) permettant d'apprécier le pourcentage de cellules produisant les FRO.

Tableau 3. Déficits immunitaires avec absence de lymphocytes T (DICS)

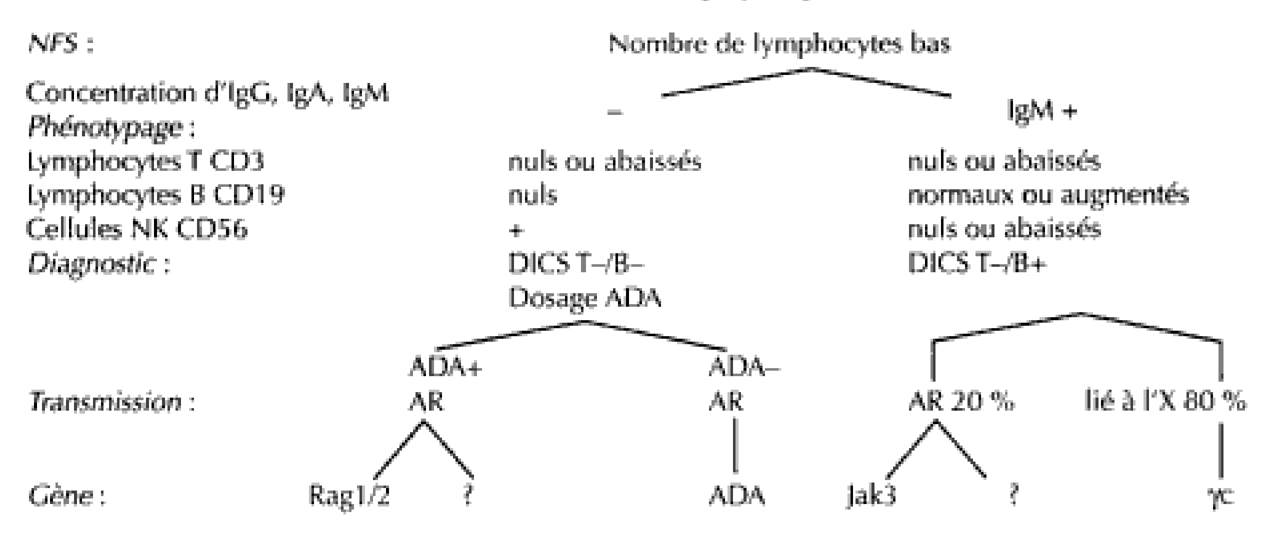
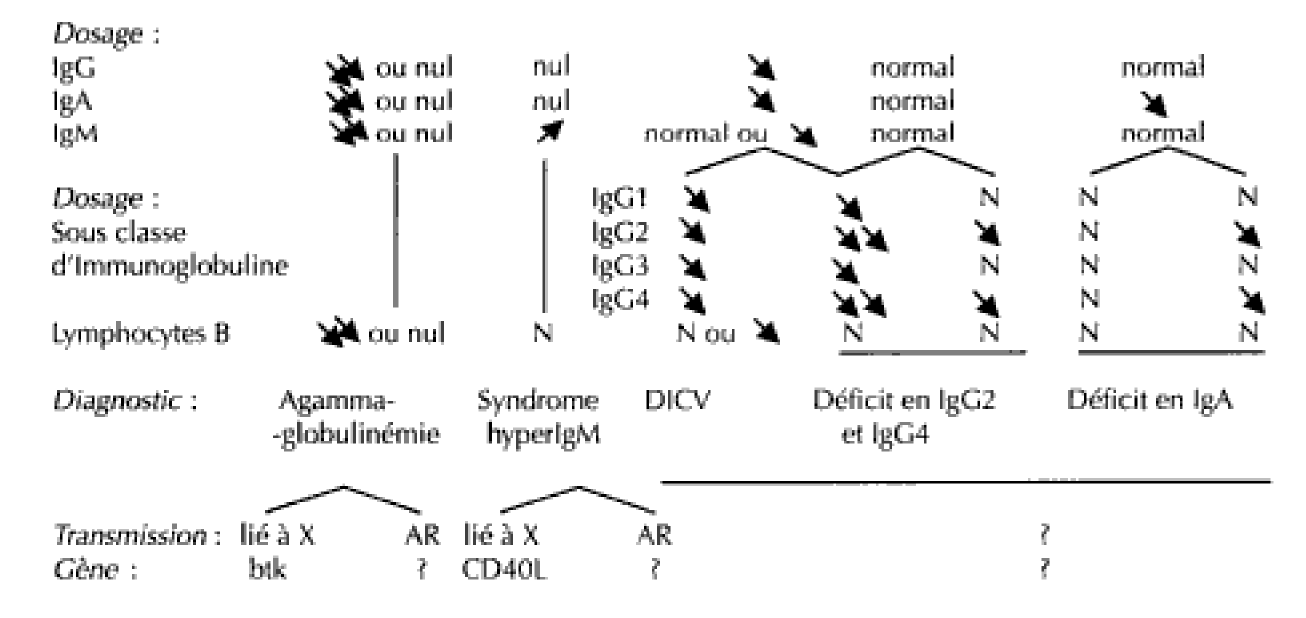


Tableau 4. Déficits immunitaires avec présence de lymphocytes T (DI combiné)

NFS :	Nombre de lymphocytes variable		Lymphopénie
Concentration d'IgG, IgA, IgM	normale ou abaissée		+/–
Phénotypage :			
Lymphocytes T CD3	variables		abaissés
Lymphocytes B CD19	+		+
Cellules NK CD56	+		+/–
Test fonctionnel des lymphocytes T :	Défaut de la réponse réponse spécifique	Défaut d'activation des lymphocytes T	Signes cliniques associés
Diagnostic :	Défaut d'expression HLA classe II sur monocytes et lymphocytes B	Zap70 cytokines	Wiskott Aldrich Di George Ataxie télangiectasie

Tableau 5. Déficits de l'immunité humorale



Enfin, un dosage de l'activité CH50 du complément permet de quantifier sa fonction hémolytique (mesure de la lyse d'hématies sensibilisées). Cette mesure permet de dépister un déficit global avant d'affiner pour déterminer quel type de protéine est déficitaire.
La plupart des DIP sont héréditaires ; les défauts moléculaires qui conduisent à ces dysfonctionnements sont en général déterminés. Quand l'anomalie génétique est identifiée dans une famille à risque, une étude familiale permet de repérer les enfants atteints et les parents potentiellement transmetteurs (recherche de mutation par SSCP et séquençage), et un diagnostic prénatal peut être proposé sur biopsie du trophoblaste.

II. Classification des principaux déficits immunitaires primitifs

A. Déficits de la lignée lymphoïde

Les DIP lymphoïdes résultent de défauts qui apparaissent tôt dans les voies du développement et qui conduisent à une susceptibilité aux infections plus graves que les déficits isolés en immunoglobulines. L'éventail de ces déficits va du déficit immunitaire combiné sévère, dans lequel les fonctions des cellules T sont absentes, à d'autres désordres dans lesquels la réponse est inadéquate.

1. Déficit immunitaire combiné sévère (DICS)

Le DICS a été décrit pour la première fois il y a plus de trente ans (déficit en ADA, 1972). Il est rare (1/50 000 à 100 000 naissances) mais bien défini.
Ce syndrome est caractérisé par une grave dégradation fonctionnelle, à la fois de l'immunité humorale et de l'immunité à médiation cellulaire, et par une susceptibilité à des infections fongiques, bactériennes et virales particulièrement graves. Il est généralement congénital et peut être hérité sur un mode lié au sexe ou autosomique récessif, ou encore être sporadique. Les nourrissons affectés survivent rarement au-delà de 1 an sans traitement.
Ce syndrome a été associé à des anomalies diverses du développement des cellules immunocompétentes.
Les enfants atteints de DICS sont lymphopéniques dans 90 % des cas. Les lymphocytes T sont absents ou fortement diminués tandis que les lymphocytes B peuvent être présents, mais leur activité fonctionnelle peut être faible voire nulle. On note une absence de réponse proliférative des lymphocytes aux mitogènes, aux antigènes et aux cellules allogéniques *in vitro*, même à partir d'échantillons collectés *in utero* ou de sang de cordon.
Les concentrations en immunoglobulines sont diminuées voire nulles, et il n'y a pas d'anticorps produit dans le processus d'immunisation. Tous les patients ont classiquement un très petit thymus (< 1 g) qui ne contient pas de thymocytes. Les formations thymus-dépendantes de la rate sont déplétées en lymphocytes et les ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer, les amygdales et les végétations sont extrêmement peu développées.

La forme la plus commune est le déficit en γc, 5 autres formes à transmission autosomique ont été identifiées. Les anomalies concernent les délétions des gènes codant pour l'adénosine désaminase (ADA), la chaîne α du récepteur de l'IL-7, la Janus kinase 3 (Jak3), le CD45, le *recombinase activating gene* (Rag1 ou Rag2) et la déficience Artémis.

Tableau 6. Défauts moléculaires des DICS et phénotype lymphocytaire

	Mutation responsable	Localisation génétique	Fréquence relative	Phénotype lymphocytaire		
				T	B	NK
DICS lié à l'X	Gène γc	Xq13	44 %	–	+	–
DICS à transmission autosomique récessive	Gène ADA	20q13	16 %	–	–	–
	Gène Jak3	19p13	6 %	–	+	–
	Gène IL-7R	5p13	10 %	–	+	+
	Rag1 ou Rag2	11p13	3 %	–	–	+
	Artémis	10p	Rare	–	–	+
	Gène CD45		Rare	–	+	

a) DICS T– B+

- Déficit en γc

  Le déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X (ou DICS-X) touche un garçon sur 300 000. C'est la forme la plus commune des DICS. Les manifestations cliniques de cette maladie sont graves et diagnostiquées précocement, entre 2 et 9 mois. Les infections opportunistes, notamment respiratoires (ORL, pulmonaires) et digestives sont précoces et fréquentes. De nombreux micro-organismes (bactéries ou virus) déclenchent des infections graves chez ces enfants, alors qu'ils passent souvent inaperçus chez les autres enfants non atteints.

  Le déficit immunitaire en cause résulte de l'absence totale de lymphocytes T et de cellules tueuses NK (*natural killer*). Le nombre de lymphocytes B reste normal ou élevé mais la production d'immunoglobulines est altérée. Chez ces individus, les cellules précurseurs (cellules souches hématopoïétiques) logées dans la moelle osseuse ne sont pas capables de se différencier en lymphocytes T et en cellules NK. Le gène anormal responsable a été localisé en Xq13. Une mutation du gène de la sous-unité protéique gamma-c, commune à plusieurs récepteurs de cytokines (interleukines-2,-4,-7,-9,-15 et -21) présents à la surface des cellules précurseurs des lymphocytes T et des cellules NK, explique l'absence totale de ces cellules sanguines chez les jeunes malades : en temps normal, les récepteurs de cytokines constitués de la sous-unité gamma-c reçoivent des signaux et transmettent aux cellules précurseurs des messages essentiels à leur transformation en lymphocytes T et cellules NK. Chez les enfants atteints de DICS-X, le défaut d'interaction IL-7/RIL-7 est responsable de l'absence de lymphocytes T, et celui de l'interaction IL-15/RIL-15 de celle de cellules NK car l'IL-15 permet la différenciation de cellules CD34 médullaires en cellules NK.

- Déficit en Jak3
  Bien qu'appartenant au groupe de maladies à transmission autosomique récessive, le DICS, lié à un déficit en Janus kinase 3 (Jak3) a des caractéristiques proches de celles des patients ayant un déficit lié à l'X : augmentation du pourcentage de cellules B (non fonctionnelles), et très faible taux de cellules T et NK. Jak3 est une molécule de signalisation associée à γc. Elle est impliquée dans la transmission du signal venant du récepteur IL-2.
- Déficit en IL-7Rα
  Les patients atteints de ce déficit ont une mutation du gène codant pour le IL-7Rα situé sur le chromosome 5p13. Ils sont déficients en cellules T mais pas en cellules B ni NK, malgré une anomalie fonctionnelle des cellules B.
- Déficit en CD45
  Une autre découverte récente est la mutation d'un gène codant pour la protéine de surface leucocytaire CD45. Cette protéine transmembranaire a des fonctions de la tyrosine phosphatase ; elle régule les kinases Src nécessaires à la transduction des récepteurs aux antigènes des cellules T et B. Les rares patients concernés par ce déficit ont un nombre de lymphocytes T très bas mais un nombre normal de cellules B. Les cellules T ne répondent pas aux mitogènes et les immunoglobulines sériques diminuent avec le temps.

b) DICS T– B–

- Dysgénésie réticulaire
  La dysgénésie réticulaire est un défaut des cellules souches affectant la maturation de tous les leucocytes ; il en résulte une sensibilité aux infections de toute une variété de micro-organismes, associée à des infections graves et une mortalité précoce.
- Déficit en adénosine désaminase (ADA)
  La moitié des patients atteints de DICS autosomique récessif sont déficitaires en une enzyme impliquée dans le métabolisme des purines, à savoir l'adénosine désaminase (ADA). Les gènes codant pour cette enzyme sont situés sur le chromosome 20q13-ter. Il y a différentes formes de déficiences en ADA, incluant la présence d'anomalies multiples du squelette et de dysplasie chondro-osseuse visible en radiographie. Une particularité de cette maladie est l'association à une lymphopénie inférieure à 500/mm^3. Le déficit en ADA provoque une accumulation intracellulaire de 2'déoxyadénosine, et de 2'o méthyladénosine. Ces métabolites toxiques, en interférant avec la synthèse d'ADN, induisent l'apoptose des thymocytes et des lymphocytes circulants.
- Déficit en Rag1 et Rag2
  Cette pathologie transmise selon le mode autosomique récessif se traduit par une susceptibilité aux infections, due à un déficit fonctionnel complet des cellules B et T. Cependant, le phénotype lymphocytaire diffère : on note l'absence de lymphocytes T et B mais la présence en cellules NK. Les gènes Rag1 et Rag2 (*recombinase activating genes*), situés sur le chromosome 11p13, codent pour des protéines indispensables aux réarrangements somatiques des gènes des récepteurs aux antigènes des lymphocytes T et B. Ces protéines reconnaissent les séquences signal de recombinaison et introduisent une cassure de l'ADN double-brin permettant les réarrangements des gènes V, D et J. Les mutations de Rag1 et Rag2 empêchent la formation des récepteurs aux antigènes par recombinaison génétique.

- Déficit du produit du gène Artémis
  Cette pathologie, plus récemment découverte, est due à un défaut de réparation de la recombinaison ADN V(D)J par une protéine appartenant à la superfamille des métallo-bêtalactamases, et codée par un gène situé sur le chromosome 10p appelé Artémis. Cela empêche la réparation de l'ADN après que la coupure a été réalisée par les produits des gènes Rag1 et Rag2, d'où une autre forme de déficit en lymphocytes T et B. Les patients ont de plus une susceptibilité particulière aux radiations des fibroblastes de la peau et de la moelle osseuse.

c) DICS T+ B–

- Syndrome d'Omenn
  Ce syndrome est caractérisé sur le plan clinique (outre les infections sévères et récurrentes) par une érythrodermie et une alopécie à début précoce, une diarrhée sévère associée à une hépatosplénomégalie et des adénopathies. Sur le plan biologique, il existe d'une manière constante une hyperéosinophilie et une importante hyperlymphocytose (entre 10 000 et 20 000/mm^3). Cette dernière est constituée de lymphocytes T CD3+, les lymphocytes B étant le plus souvent absents. L'étude des sous-populations T CD4+ et CD8+ montre, dans certains cas, la prédominance d'une des sous-populations lymphocytaires, témoignant de la pauciclonalité des lymphocytes T circulants. Le déficit humoral associé est caractérisé par une absence d'IgG, d'IgM, et d'IgA, contrastant avec une hypergammaglobulinémie de type E. Il a été récemment montré que ce déficit immunitaire était dû à des mutations des gènes Rag1 et Rag2.

2. Autres déficits immunitaires combinés

Un nombre croissant d'anomalies plus rares est reconnu comme pouvant engendrer des déficits immunitaires combinés moins sévères.

a) Défaut d'activation lymphocytaire T

- Déficit en CMH de classes I et II
  Quelques cas de déficits partiels d'expression des molécules du CMH de classe I ont été rapportés. Ces patients présentaient parfois tardivement des infections pulmonaires chroniques, souvent associées à une sinusite chronique, parfois une vascularite. L'expression des molécules du CMH de classe I à la surface des cellules de ces patients est estimée de 1/30 à 1/100 de la normale. Cette anomalie est secondaire à une mutation du gène codant pour TAP1 et TAP2 (6p21.3), protéines dont le rôle est de transporter les peptides antigéniques du cytosol vers le réticulum endoplasmique (jonction de la chaîne alpha du CMH de classe I à la bêta 2-microglobuline). Il n'existe pas de déficit des lymphocytes T et B associé, excepté une lymphopénie CD8+ associée à une sensibilité à l'infection virale.
  De la même façon, un défaut d'expression des molécules de classe II se caractérise par un défaut d'expression de ces molécules par toutes les cellules qui, normalement, les expriment (monocytes, lymphocytes B, lymphocytes T activés). Les manifestations présentes dès l'enfance sont une diarrhée persistante souvent associée à une cryptosporidiose, et des pneumonies bactériennes ou virales. Il s'agit d'une maladie à transmission autosomique récessive appelée aussi « syndrome des lymphocytes nus ».

Quatre défauts moléculaires sont associés à ce déficit. Le premier est la mutation du gène codant pour la protéine RFX5 (1q), un complexe multiprotéique qui lie la boîte X du promoteur du MHC II. La deuxième forme est due à des mutations d'un gène situé en 13q qui code pour une deuxième unité du complexe RFX, la RFX – *associated protein* (RFXAP). Plus récemment découverte, mais la plus courante, est la mutation de RFXANK, la troisième sous-unité. Enfin, un coactivateur CIITA qui stabilise ces complexes sans se lier à l'ADN peut être muté (16p13). Si les trois premiers facteurs sont exprimés de façon constitutive, CIITA contrôle la spécificité tissulaire et l'expression du CMH de classe II inductible par l'interféron gamma.
L'absence de présentation du peptide antigénique lié au défaut d'expression des molécules du CMH de classe II a pour conséquence un déficit de l'immunité cellulaire (les lymphocytes T sont incapables de proliférer en présence d'un antigène vaccinal), et un déficit de l'immunité humorale (diminution variable du taux des IgG et des IgA, et sérologies vaccinales négatives).

- Déficit en CD3
Le défaut partiel d'expression du CD3 est un déficit extrêmement rare, lié à la mutation des gènes codant pour une chaîne constituant le CD3 (11q23). Le taux de lymphocytes T CD3+ est normal mais il y a une diminution d'expression du complexe CD3/TcR à la surface des lymphocytes T (entre 10 et 50 % de l'expression normale). Le déficit humoral associé est variable.
- Déficit en ZAP 70
Le déficit en ZAP 70 (*zeta chain associated protein 70*) est un déficit immunitaire qui associe une absence totale de lymphocytes T CD8 et un défaut fonctionnel complet des lymphocytes T CD4, qui sont pourtant en nombre normal. Ces lymphocytes ne répondent pas aux mitogènes *in vitro*, ni aux cellules allogéniques pour générer des lymphocytes T cytotoxiques. Malgré des taux d'immunoglobulines sériques normaux (voire augmentés), les sérologies sont négatives. Les patients peuvent présenter durant l'enfance des infections récurrentes parfois sévères et fatales, mais souvent vivent plus longtemps et sont diagnostiqués plus tard que les patients ayant un DICS.
ZAP 70 est une tyrosine kinase impliquée dans l'activation des lymphocytes T (et dont le gène est situé en 2q12). Elle joue un rôle essentiel dans la sélection thymique positive et négative. Une hypothèse est que certains lymphocytes T CD4+ pourraient être activés par d'autres membres de la même famille de tyrosines kinases, ce qui permettrait de maintenir un taux normal.

b) Déficit en purine nucléoside phosphorylase

Le déficit en purine nucléoside phosphorylase (PNP) est une maladie autosomique récessive. Le gène codant pour la PNP est situé sur le chromosome 14q13.1. Une variété de mutations ont été trouvées. Ce déficit enzymatique, qui se traduit par une accumulation de déoxyguanosine triphosphate, est responsable de la destruction des cellules en division.
Deux tiers des patients ont des anomalies neurologiques, allant de la spasticité au retard mental. Un tiers est atteint de maladies auto-immunes, le plus souvent associées à une anémie hémolytique auto-immune. La plupart des patients ont un taux normal ou élevé d'immunoglobulines et sont lymphopéniques (< 500/mm^3). La fonction T est faible mais non absente et variable dans le temps.

L'acide urique sérique et urinaire est déficient car la PNP est nécessaire pour former les précurseurs hypoxanthine et xanthine. Le diagnostic prénatal est possible. Ce déficit est fatal dans l'enfance. La transplantation de moelle osseuse, traitement de choix, n'est pas toujours accompagnée de succès.

3. Déficits immunitaires avec défaut de différenciation des lymphocytes B

a) Agammaglobulinémie liée à l'X (hypogammaglobulinémie de Bruton)

Les individus affectés ont très peu de lymphocytes B circulants porteurs d'immunoglobulines membranaires ; ils présentent un taux très faible d'IgG et rarement d'autres classes d'immunoglobulines. Enfin, ils présentent un défaut de follicules lymphoïdes primaires et secondaires.
Dans cette maladie, il y a un défaut du signal dans les cellules B, dû à un défaut de transduction d'une tyrosine kinase dite de Bruton (Btk). Ce blocage du développement des cellules préB aux cellules B contraste avec les arrêts plus précoces ou plus tardifs observés dans les autres déficits immunitaires. Le gène déficitaire a été localisé en Xq21. L'administration substitutive d'anticorps est nécessaire mais le pronostic reste sombre. Les garçons porteurs de ce syndrome commencent par présenter des infections bactériennes récurrentes à la fin de leur première année, après que les immunoglobulines maternelles ont disparu.

b) Agammaglobulinémie de transmission autosomique récessive

10 % des cas d'agammaglobulinémie ne sont pas liés à une mutation du gène Btk. Ces formes sont caractérisées par un blocage précoce de la différenciation des lymphocytes B (stade proB-préB). Des anomalies génétiques identifiées affectent la chaîne lourde μ des immunoglobulines et la pseudo-chaîne légère delta5 exprimée par les précurseurs des lymphocytes B.

c) Déficit en ligand du CD40 ou syndrome d'hypergammaglobulinémie à IgM lié à l'X

Ce syndrome est caractérisé par un déficit en IgG, IgA et IgE, associé à des taux élevés d'IgM, atteignant parfois dix fois la normale. Ce syndrome est héréditaire et apparaît comme une forme liée à l'X, mais certaines formes peuvent être autosomiques récessives.
On trouve dans le sang périphérique et dans le tissu lymphoïde des patients atteints un nombre élevé de plasmocytes sécréteurs d'IgM et un taux élevé d'anticorps contre les neutrophiles, les plaquettes et les globules rouges. Le défaut se trouve dans le gène codant pour le ligand du CD40 (CD40L ou CD154) situé en Xq26. Les cellules T CD4 n'expriment pas de CD40L à leur surface, il n'y a donc plus d'interaction possible avec le CD40 situé sur les lymphocytes B. L'absence de ce signal de costimulation inhibe la réponse B aux antigènes dépendants de cellules T. Il y a perte de la commutation de classe vers les isotypes IgG, IgA, ou IgE et une incapacité à produire des cellules B mémoire.
Cependant, la réponse B aux antigènes indépendants de la cellule T n'est pas affectée, ce qui explique la production d'IgM.

d) Déficit immunitaire commun variable

Le déficit immunitaire commun variable (DICV) correspond à un groupe hétérogène de syndromes révélés par des infections pulmonaires chroniques ou intestinales. Ce déficit est assez fréquent (1/25 000 à 1/100 000 cas). L'association décrite à une splénomégalie, des adénopathies et une hyperplasie lymphoïde à localisation gastro-intestinale pourrait être liée à une prolifération des lymphocytes B capables de reconnaître l'antigène mais pas de se transformer en plasmocyte. Enfin, des maladies auto-immunes peuvent apparaître (syndrome de malabsorption et maladie de Biermer fréquemment retrouvés). L'hypogammaglobulinémie touche parfois uniquement les IgA, les IgG2 et les IgG4 mais s'aggrave dans le temps. Les IgM sont souvent épargnées. Le taux de lymphocytes B circulants est généralement normal ou peu diminué. La réponse anticorps aux antigènes infectieux ou vaccinaux peut être affectée de façon variable. Cet état se manifeste habituellement plus tardivement que les autres déficits. Le diagnostic est un diagnostic d'exclusion.

e) Déficit isolé en IgA

Ce déficit est le plus fréquemment rencontré (environ 1/600 en Europe). Il est beaucoup moins fréquent dans les populations d'origine asiatique et africaine. Enfin, il est fréquemment associé à certains haplotypes du CMH chez les Caucasiens. Le ou les gènes en cause peuvent être localisés dans la région du chromosome 6 codant pour le CMH de classe III.
Dans de rares cas, 2 sous-classes IgA1 et IgA2 sont déficientes dans le sérum et les sécrétions muqueuses. Ce déficit n'est pas forcément très pathogène. Néanmoins, certains sujets développent des infections respiratoires plus ou moins fréquentes et de gravité variable, avec un risque de dilatation des bronches. Les diarrhées chroniques compliquent aussi la maladie. L'incidence de l'asthme et d'autres maladies atopiques est élevée. La polyarthrite rhumatoïde et le lupus peuvent également être associés de façon significative.
Des concentrations basses en IgG2 et IgG4 sont associées aux déficits en IgA compliqués d'infections fréquentes. Le déficit en IgA est souvent familial mais peut apparaître de façon sporadique. La pathogénie de ce déficit, qu'il soit transmis génétiquement ou causé par une agression de l'environnement, fait suite à un blocage lors de la différenciation terminale du lymphocyte B. Chez les enfants normaux ou les adultes, la plupart des lymphocytes B porteurs d'IgA présentent seulement cette classe d'immunoglobuline à leur surface, alors que chez les patients déficients en IgA et les nouveau-nés normaux, les lymphocytes à IgA portent aussi à leur surface des IgM.
Ce phénotype immature est associé chez la plupart des patients à une insuffisance de sécrétion d'IgA par les lymphocytes stimulés en culture. On suspecte fortement un défaut primaire dans les interactions régulatrices essentielles, entre les cellules T et B.

4. Anomalie des cytokines et leurs récepteurs

a) Déficit en IL-12 et IFN gamma

L'IFN gamma, cytokine produite par les lymphocytes Th1, active la transcription du facteur STAT1 (*signal transducer and activator of transcription – 1*). L'IL-12, cytokine composée de deux sous-unités IL-12p40 et IL-12p35, active ce processus. Son récepteur est donc un hétérodimère constitué de IL-12R bêta1 et IL-12R bêta2.

Les patients présentant des mutations pour les gènes codant, soit pour les sous-unités du récepteur à l'IFN gamma (l'IFN gamma R1 ou R2), soit pour STAT1, IL-12p40 ou IL-12R bêta1, présentent des infections à mycobactéries atypiques ou à salmonelles. L'augmentation de la susceptibilité aux cancers trouvée chez la souris mutée reste à établir chez l'humain.

b) Déficit en TNF et FAS

Une autre famille avec plus de 20 membres est la superfamille du TNF. Les mutations du récepteur I du TNF sont associées à une maladie inflammatoire appelée TRAPS (TNFR-*associated periodic syndrome*) qui appartient à la famille des fièvres périodiques héréditaires. Par ailleurs, un autre couple récepteur/ligand appartenant à la famille du récepteur TNF, peut être touché. Il s'agit de FAS/FASL, qui régule l'apoptose des lymphocytes. Les déficits en FAS/FASL et en CASP10 (caspase-10, une autre molécule proapoptotique plus récemment découverte) induisent des pathologies auto-immunes et lymphoprolifératives chez les patients qui ont un risque accru de développer des lymphomes.

c) Déficit de la voie NF-KappaB

Les facteurs de transcription de la famille NF-Kappa B jouent un rôle important dans l'immunité aux infections. Chez l'homme, plusieurs déficits immunitaires associés à cette voie de signalisation ont été décrits. Le déficit autosomique récessif en IRAK4, une kinase régulant le complexe IkappaB-kinase, est associé à un phénotype infectieux précoce (*Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* fréquemment retrouvés) mais qui s'estompe avec le temps. Les taux d'anticorps sont normaux mais la réponse aux lipopolysaccharides et l'induction d'IL-1-bêta, d'IL-6, d'IL-12, de TNF alpha et d'IFN gamma peut être déficiente.

5. Autres déficits immunitaires spécifiques

a) Ataxie télangiectasie

L'ataxie télangiectasie est une maladie autosomique récessive caractérisée par une ataxie cérébelleuse, des télangiectasies de localisation oculaire se développant entre 3 et 6 ans, une atteinte pulmonaire chronique et un déficit immunitaire. Le gène responsable est situé sur le bras long du chromosome 11 (11q22-23). Il code pour une protéine kinase nucléaire qui pourrait participer à la transduction du signal mitogénique, la recombinaison méiotique et le contrôle du cycle cellulaire. L'ataxie du tronc survient généralement dans l'enfance sur un mode progressif. Le déficit immunitaire peut être perceptible cliniquement à cause de la survenue d'infections pulmonaires et sinusiennes répétitives, évoluant vers la chronicité et aboutissant au développement de dilatations bronchiques. Les deux causes les plus fréquentes de mort sont la pathologie pulmonaire chronique et les néoplasies. Les lymphomes sont le plus souvent rencontrés.

Les anomalies immunologiques semblent être secondaires à un développement thymique anormal. Le pool des cellules périphériques est fréquemment réduit, notamment dans les compartiments tissulaires lymphoïdes. L'anergie cutanée et le rejet retardé de greffes de peau sont fréquemment observés. Bien que le nombre de

lymphocytes B et la distribution des isotypes d'immunoglobulines soient en général normaux, la plupart des patients présentent un déficit en IgE et en IgA sériques, tandis qu'un petit nombre d'entre eux ont des taux réduits en IgG sériques, surtout au sein des sous-classes IgG2 et IgG4. Les taux d'IgM et d'IgD sont habituellement normaux. Certains cas d'ataxie télangiectasie peuvent survenir dans le cadre d'un défaut généralisé de différenciation cellulaire, en rapport avec des mécanismes défectueux de la réparation de l'ADN, d'où la haute incidence de néoplasie chez ces patients. Les cellules en culture de ces patients sont hautement sensibles aux lésions chromosomiques induites par les radiations.

b) Syndrome de Wiskott-Aldrich

Le syndrome de Wiskott-Aldrich est un syndrome lié à l'X récessif caractérisé par un eczéma, un purpura thrombopénique avec un taux normal de mégacaryocytes mais de petites plaquettes défectueuses, et une sensibilité accrue aux infections. Des dermatites atopiques et des infections récurrentes (otites, pneumonies, méningites à pneumocoque ou septicémie) se développent dès la première année de vie. Plus tard, des infections à germes opportunistes peuvent se développer (*Herpes virus* ou *Pneumocystis carinii*). Peuvent survenir également des affections auto-immunes ou des vascularites. La plupart des garçons atteints décèdent avant l'âge de 10 ans de complications hémorragiques, infectieuses ou de néoplasies lymphoïdes.
Les taux sériques d'IgM sont habituellement bas alors que ceux d'IgG sont normaux ; enfin, ceux d'IgE et d'IgA sont souvent élevés. Le nombre de lymphocytes B et la distribution des différentes classes d'immunoglobulines sont en général normaux.
Ces garçons sont incapables de produire des anticorps en réponse aux antigènes polysaccharidiques de façon normale et efficace. Les réponses aux antigènes protéiques sont souvent conservées au début de l'évolution de la maladie. Le nombre de cellules T diminue avec le temps chez la plupart de ces patients, mais une élévation, relevée sur un groupe de garçons affectés, laisse suggérer que les anomalies des cellules T sont secondaires. Ces enfants deviennent fréquemment anergiques, et leurs cellules T ne répondent pas normalement à un rappel d'antigènes ubiquitaires.
Le gène responsable est situé en Xp11.22-11.23. Son expression est limitée aux lignées lymphocytaires et mégacaryocytaires. Il code pour une protéine de 501 acides aminés, riche en proline appelée WASP (WAS protéine). Cette protéine lie CDC42H2 et RAC, membres de la famille des GTPases qui jouent un rôle important dans la polymérisation de l'actine.
Plusieurs mutations de WAS ont été identifiées chez les patients atteints, avec une corrélation entre le site de mutation et la sévérité de l'infection. Le diagnostic prénatal peut être réalisé par étude du gène WAS par amniocentèse si la mutation est connue dans la famille, ou sur échantillon de villosités chorioniques.

c) Syndrome de Di George

Le syndrome de Di George, ou hypoplasie thymique, est un exemple de déficit isolé en cellules T qui résulte d'une anomalie de développement des éléments de l'épithélium thymique dérivés du 3e ou du 4e arc pharyngé. On peut également observer chez les patients un défaut de développement d'autres organes dérivant partiellement des cellules provenant de la crête neurale embryonnaire.

Les nourrissons affectés présentent habituellement des anomalies cardiaques congénitales qui touchent en particulier les gros vaisseaux, et des accès de tétanie dus à un défaut de développement des parathyroïdes ; enfin, on trouve l'absence d'un thymus normal. Les concentrations sériques en immunoglobulines sont fréquemment normales mais les réponses anticorps, en particulier isotypiques IgG et IgA, sont habituellement affectées. La numération lymphocytaire peut être proche de la normale mais il s'agit uniquement de lymphocytes B.
Le syndrome de Di George peut affecter aussi bien les hommes que les femmes. De rares cas familiaux à transmission autosomique dominante ont été décrits. Des microdélétions en 22q11.2 ont été retrouvées chez la majorité des patients.

B. Déficits de la lignée myéloïde

Le système phagocytaire appartient à la réponse immunitaire innée dont les acteurs sont les polynucléaires (neutrophiles et éosinophiles), monocytes et macrophages. Les principales fonctions phagocytaires sont la diapédèse, l'adhérence à l'endothélium, l'endocytose et la destruction des particules ingérées.

1. Déficit de l'adhérence leucocytaire (LAD)

Les molécules de la surface cellulaire appartenant à la famille des intégrines se comportent comme des molécules d'adhérence et sont nécessaires pour faciliter l'interaction cellulaire.
Trois d'entre elles (LFA-1, Mac-1, et gp 150/95, appelées aussi CD11a, b, et c) ont une chaîne bêta commune (CD18) et sont présentes de façon variable sur les différentes cellules phagocytaires ; CD11a étant aussi exprimée sur les cellules B. Une anomalie de cette bêta 2 intégrine commune (gène situé en 21q22.3) est responsable d'un premier syndrome appelé LAD I. Une deuxième forme (LAD II) est due à l'expression déficiente du déterminant sialyl Lewis X, ligand pour les E et P sélectines. La mutation d'un transporteur GDP fructose aurait récemment été mise en cause.
Ces défauts moléculaires sont la cause d'une sensibilité à l'infection par les bactéries ou les champignons du fait de la limitation des fonctions d'adhérence à l'endothélium et donc de mobilisation des leucocytes sur le site de l'inflammation.
L'immunité virale est également atteinte du fait de la coopération défectueuse entre les cellules T et B, causée par le défaut d'adhérence. La traduction clinique de ce déficit est variable et dépend de l'expression résiduelle de ces glycoprotéines d'adhérence : certains patients meurent en quelques années tandis que d'autres survivent jusqu'à l'âge adulte. Le diagnostic est évoqué devant une hyperleucocytose importante (pouvant atteindre 100 000/mm^3) et des infections cutanées non purulentes. On peut mettre en évidence par immunofluorescence l'absence de l'expression de ces 4 protéines présentes, à l'état physiologique, sur la membrane des polynucléaires.

2. Syndrome de Buckley

Ce syndrome, également connu sous le nom de syndrome de Job ou hyper IgE, est transmis de façon autosomique dominante (gène candidat situé en 4p). Il est

caractérisé par des abcès cutanés et pulmonaires à répétition, et une concentration élevée d'IgE sériques liée à une réaction d'hypersensibilité à *Staphylococcus aureus* et à *Candida albicans*.
D'autres signes cliniques sont rapportés tels qu'un faciès particulier (cheveux roux, yeux bruns), des fractures à répétition, une hyperlaxité ligamentaire, une scoliose ou un retard à la chute de la première dentition. Sur le plan immunologique, il existe chez les patients une anomalie dans la régulation de la production d'IgE due à un déséquilibre des cellules Th1 et Th2, conduisant à un défaut de production d'IFN gamma et à un excès d'IL-4.
Ex vivo, les polynucléaires neutrophiles ont, de manière inconstante, une diminution de leur capacité de migration vis-à-vis de la plupart des composants chimio-attractants.

3. Syndrome de Chediak-Higashi

Ce syndrome est une affection rare de transmission autosomique récessive (gène en 1q42-q44), caractérisé par des infections à pyogènes répétées, surtout à *Staphylococcus aureus*. À l'adolescence, certains ont un pseudolymphome avec hémophagocytose, une parodontite, un albinisme partiel oculocutané, une neuropathie périphérique progressive.
Les neutrophiles en particulier, et toutes les cellules contenant des lysosomes, ont des granules géants dans leur cytoplasme. Cela serait dû à un défaut de fluidité de la membrane qui conduit à une fusion anormale des granules, ainsi qu'à l'incapacité des cellules à migrer normalement. L'expression des récepteurs de surface est également altérée, ce qui pourrait être à l'origine de désordres dans l'assemblage de microtubules, et d'une interaction défectueuse de ces derniers avec la membrane des lysosomes. La capacité des neutrophiles et des monocytes à digérer des micro-organismes est diminuée du fait de la lenteur de la fusion des granules lysosomiaux avec les phagosomes. 85 % des patients ont une infiltration organique par des histiocytes et des lymphocytes atypiques. Une pancytopénie est habituelle, les fonctions lymphocytaires T CD8 et NK sont anormales.

4. Granulomatose septique chronique : absence d'explosion oxydative

Encore appelé granulomatose familiale chronique (CGD : *chronic granulomatous disease*), ce déficit touche environ 1/500 000 à 1 000 000 naissances. Il se caractérise par la survenue, dès le plus jeune âge, d'infections graves et répétées à bactéries Gram + et – (*Staphylococcus aureus, Salmonella, Pseudomonas cepacia, Serratia marcescens*, etc.) et fongiques (*Aspergillus, Candida albicans*).
Ces infections sont de localisations multiples au niveau des surfaces normalement colonisées par des agents pathogènes, c'est-à-dire la peau, les poumons, et le tractus gastro-intestinal. Les manifestations les plus fréquentes sont donc des pyodermites, des pneumopathies avec abcès pulmonaires, des atteintes oto-rhino-laryngologiques multiples ; on observe également des lymphadénites, une hépatosplénomégalie accompagnée parfois d'abcès hépatiques et spléniques, une ostéomyélite. L'accumulation de neutrophiles autour du foyer infectieux peut donner une symptomatologie digestive granulomateuse ressemblant à la maladie de Crohn. Une infection disséminée secondaire à la vaccination par le BCG peut être observée.

Les cellules phagocytaires des patients atteints se déplacent et ingèrent normalement les micro-organismes mais ne les détruisent pas, car elles sont incapables de produire correctement les anions superoxydes et les autres formes réactives de l'oxygène (FRO) qui en dérivent, en réponse à une stimulation. Ces déficits sont dus à des mutations des gènes codant pour les différentes protéines de la NADPH oxydase : cytb558 (gp91 phox ou p22 phox), p47 phox, p67 phox.
La forme la plus fréquente (au moins 2/3 des cas), aboutissant à une absence ou une anomalie d'activité de la gp91 phox, est liée au chromosome X. De très nombreuses mutations ont été trouvées sans génotype prédominant ; de plus, la généralisation de la recherche de ces mutations a mis en évidence des variants avec NADPH oxydase peu fonctionnelle et faible production de FRO. Les autres sont autosomiques récessives (*tab.* 7).
Le déficit en p40 phox, autre composant de la NADPH oxydase, n'a pas encore été décrit. Le diagnostic de la maladie peut être fonctionnel (absence de production des FRO par les cellules phagocytaires par le test de réduction du cytochrome c, par chimioluminescence, par le test de réduction au NBT qui ne nécessite que très peu de prélèvement et est donc adapté au diagnostic des nouveau-nés et au diagnostic anténatal).
La mesure par cytométrie en flux de la production d'H_2O_2 est plus récente. L'acétate de dichlorofluorescine (DCFH-DA), qui pénètre dans la cellule, est clivé en DCFH par les estérases intracellulaires et oxydé par l'H_2O_2 produit après activation des phagocytes en dichlorofluorescéine (DCF) qui fluoresce dans le vert à 488 nm).
Ces 2 derniers tests permettent, dans les cas de granulomatose liée au chromosome X, de mettre en évidence l'existence d'une double population de polynucléaires neutrophiles chez les femmes vectrices de la maladie.
La confirmation du diagnostic peut ensuite se faire par western-blot avec des anticorps dirigés contre chacun des composants de la NADPH oxydase. Le séquençage du gène peut ensuite être réalisé.
L'étude familiale permet de dépister les mères conductrices, le plus souvent asymptomatiques, mais qui peuvent néanmoins présenter une susceptibilité aux infections (lorsque la production de FRO est inférieure à 20 %), ou un lupus érythémateux disséminé.
Le diagnostic anténatal peut être réalisé sur du sang fœtal obtenu par ponction de cordon à 21 semaines d'aménorrhée, voire plus précocement sur un prélèvement trophoblastique à 11 semaines d'aménorrhée, lorsque la mutation est connue préalablement dans la famille.

Tableau 7. Différentes formes de granulomatose septique chronique

Forme de granulomatose	Protéine	Mode de transmission	Localisation du gène	Fréquence
CGDgp91	gp91 phox	Liée à l'X	Xp21.1	Entre 60 et 70 %
CGDp22	p22 phox	Autosomique récessive	16q24	5 %
CGDp67	p67 phox	Autosomique récessive	1q25	5 %
CGDp47	p47 phox	Autosomique récessive	7q11.23	Entre 30 et 40 %

C. Déficits de la voie du complément

La voie classique du complément est explorée par la mesure de l'activité CH50. Le défaut d'un composant du C1 au C9 entraîne un CH50 effondré et le diagnostic sera confirmé par le dosage spécifique des divers composants. Des défauts génétiques de tous les composants ont été décrits. Le tableau clinique lié à un déficit en complément est associé à des stigmates d'auto-immunité et de déficit immunitaire. Les déficits en C3, C5, C6, C7, et C8 sont plus particulièrement responsables d'infections à germes intracellulaires. Les déficits en protéines H et I régulatrices, entraînant un déficit en C3 par consommation, peuvent être responsables d'infections récurrentes. La voie alterne du complément, étudiée par le dosage AP50 est, en cas d'anomalie, complétée par le dosage des différents composants ; le déficit en properdine, dont le gène est situé sur le chromosome X, a été décrit.

1. Déficits en protéines précoces de la voie classique C1, C4 et C2

Les déficits complets en protéines précoces de la voie classique sont associés à une forte fréquence au lupus érythémateux disséminé (LED) ou à des maladies auto-immunes apparentées. Le CH50, test hémolytique qui explore l'activité fonctionnelle de la voie classique et de la voie finale commune, est un test très utile pour le dépistage des déficits homozygotes en un composant du complément. Les déficits complets en C4 sont exceptionnels mais sont associés dans plus de 80 % des cas à un LED. La plus forte association avec une maladie auto-immune est observée pour le déficit en C1q (94 %).
Les particularités des lupus associés au déficit homozygote en C4 et C1 sont le début précoce chez l'enfant, la fréquence des manifestations neurologiques et rénales et, sur le plan biologique, l'absence fréquente d'anticorps anti-DNA natif. Le déficit homozygote en C2 est le plus fréquent des déficits complets ; sa fréquence est de l'ordre de 1/10 000. Une maladie lupique ou apparentée au lupus apparaît dans 10 à 30 % des cas. Ces lupus sont d'évolution moins sévère, l'atteinte cutanée est fréquente ; des anticorps anti-SSA sont fréquemment mis en évidence dans le sérum.
Les bases moléculaires des déficits en protéines du complément sont diverses : le déficit en C2 de type I (95 % des cas) est associé à une délétion du gène de 28 paires de bases qui conduit à l'apparition d'un codon stop prématuré. L'étiologie moléculaire des autres déficits en C2 (type II) est dans la plupart des cas inconnue.
Les déficits en C1q sont le plus souvent liés à des mutations d'une seule base, qui est responsable dans certains cas de la production d'une protéine C1q anormale de bas poids moléculaire.
Les déficits en C4 sont liés soit à des délétions dans les gènes C4A ou C4B, soit à une non-expression (une insertion de 2 paires de base dans l'exon 29 du gène C4A est, dans certains cas, responsable de cette non-expression).

2. Déficits en C3

Les déficits héréditaires en composant C3 sont rares. Ils sont associés, avec une grande fréquence, à des infections récidivantes à pyogènes, de localisations ORL et pulmonaire, notamment à *Hæmophilus* et à pneumocoques, et des glomérulonéphrites membranoprolifératives.

3. Déficits en protéines régulatrices de la voie alterne

Les déficits en protéines régulatrices H et I entraînent un déficit acquis en C3, et s'accompagnent d'infections bactériennes sévères. Le déficit en H est souvent associé au syndrome hémolytique et urémique atypique récidivant chez de jeunes enfants. Le déficit en properdine (protéine de régulation positive de la voie alterne) codée sur le chromosome X est rare. Les femmes conductrices sont asymptomatiques ; les hommes atteints d'un déficit complet présentent des infections à *Neisseria meningitidis* (la C3 convertase se dissocie en absence de properdine et ne clive plus le C3).

4. Déficits en composants terminaux

Les déficits homozygotes en composants terminaux (C5 à C8) se compliquent principalement d'infections systémiques à *Neisseria* et notamment de méningites. Les individus déficitaires en C5, C6, C7 ou C8 ont une fréquence de méningites 6 000 fois supérieure aux individus non déficitaires, mais avec une mortalité 10 fois moindre, et un taux de récidive élevé (45 %). Il a été récemment démontré l'intérêt d'une vaccination antiméningococcique (sérotypes A, C, Y et W135) chez les sujets déficitaires en C3, properdine ou composants terminaux.

5. Déficits en MBL

Les concentrations sériques en MBL (*mannose-binding lectin*) sont fortement réduites en cas de mutations sur le gène de la protéine. La fréquence des sujets hétérozygotes pour l'allèle anormal est de 35 % dans la population normale. Une augmentation de la prévalence des infections méningococciques chez les sujets homozygotes et hétérozygotes pour MBL suggèrent que la voie des lectines est un déterminant important de la susceptibilité aux infections méningococciques.

6. Œdème angioneurotique

Les déficits héréditaires en C1 inh sont responsables de l'œdème angioneurotique caractérisé par des œdèmes récidivants de la peau et/ou des muqueuses (intestinales et laryngées). Les manifestations surviennent par poussées.
C'est une maladie autosomique dominante, résultant de délétions ponctuelles au niveau du gène. Sa fréquence est estimée à 1/10 000 naissances environ. Dans l'OAN de type I, les taux plasmatiques de la protéine représentent entre 10 et 30 % des valeurs normales (dosages immunochimiques et fonctionnels). 15 % des patients présentent un OAN de type II, caractérisé par la présence d'une protéine anormale : les taux de C1 inh sont normaux mais l'activité de la protéine est effondrée. La présence d'autoanticorps anti-C1 inh a été décrite.

7. Déficits en récepteurs du complément

Le déficit en CR3 correspond au déficit d'adhérence leucocytaire décrit ci-dessus (déficit en β2 intégrine leucocytaire CD11b/CD18).
L'hémoglobinurie paroxystique nocturne est associée à une hémolyse intravasculaire et une fréquence accrue de thromboses veineuses. Cette maladie est caractérisée par un défaut d'expression de protéines ancrées dans la membrane par des gly-

colipides, secondaire à une mutation dans le gène PIG-A. Le produit de ce gène est une glycosyl transférase. Environ 30 protéines, dont DAF (CD55) et HRF (CD59), peuvent être touchées en cas d'anomalie de ce gène ; une grande prédisposition à l'hémolyse est observée d'intensité variable selon la nature de la mutation.

III. Traitement

- Les déficits immunitaires combinés sévères représentent une urgence pédiatrique. Leur identification précoce est fondamentale pour que le traitement ait les meilleures chances de réussite.
  La thérapeutique de remplacement par injection intraveineuse d'immunoglobulines humaines n'est pas très efficace pour freiner la progression de la maladie.
  La transplantation de cellules souches issues de moelle osseuse de donneurs HLA identiques ou haploïdoidentiques peut être réalisée. La situation la plus favorable est celle de l'existence d'une personne HLA identique, avec 90 % de succès. Un tel donneur n'existe que dans 20 % des cas ; sinon le succès tombe à 70 % environ, même avec un donneur apparenté. La transplantation, si elle est effectuée dans les trois premiers mois de vie, offre 97 % de chance de survie. De récentes études ont montré que la reconstitution immunologique par transplantation de cellules souches est due à l'éducation thymique des cellules souches transplantées.
- Les protocoles de thérapie génique proposés dans les DICS visent à contourner les insuffisances de greffes de moelle osseuse. La thérapie génique est définie comme l'introduction délibérée de matériel génétique dans les cellules somatiques humaines, dans le but de corriger un défaut génétique ou de pallier le manque d'une protéine en apportant le gène responsable de sa synthèse.
  La moelle osseuse des enfants est recueillie et les cellules précurseurs des lymphocytes T et NK sont isolées. Mises en culture, ces cellules se divisent et sont ensuite infectées par un rétrovirus servant de vecteur au gène thérapeutique. 4 ou 5 jours après le prélèvement, les cellules ainsi traitées sont réinjectées par voie intraveineuse dans la circulation sanguine. Au bout de quelques mois, les premiers lymphocytes T apparaissent dans le sang.
  Après de premiers échecs dans ce domaine, une transduction réussie en cDNA γc a été réalisée avec succès dans une moelle osseuse autologue chez des enfants, par transfert de gène rétroviral, avec correction complète des défauts de leurs cellules T et NK. Cela permet d'espérer que la thérapie génique sera le traitement de choix de ces maladies dont le statut génétique commence à être connu.
- En pratique, dans certains déficits graves comme le déficit en gamma c, les patients sont obligés de vivre isolés dans une bulle stérile en attendant de pouvoir bénéficier d'une greffe de moelle osseuse. Dans le déficit en ADA, l'administration sous-cutanée une fois par semaine d'ADA exogène peut améliorer certains patients mais n'est pas aussi efficace que la transplantation de moelle osseuse comme source de cellules souches. C'est ce déficit qui a connu, par ailleurs, la première thérapie génique.
- En ce qui concerne le traitement du déficit sélectif en immunoglobuline, il est essentiellement symptomatique. Les IgA ne peuvent être efficacement rempla-

cées par un apport exogène de gammaglobulines, dont l'usage pourrait de plus accroître le risque de développement d'anticorps anti-IgA.
D'autre part, une surveillance accrue devrait avoir lieu en cas de transfusion sanguine par du sang de donneurs non déficients en IgA à cause d'un risque de choc anaphylactique accru.

- La transplantation de moelle osseuse histocompatible chez des jumeaux atteints par le syndrome Wiskott-Aldrich permet de corriger totalement les anomalies hématologiques et immunologiques. Chez les patients à qui ce traitement ne peut être proposé, la splénectomie permet d'accroître la durée de vie des plaquettes et de réduire le risque d'hémorragie grave. En raison du risque accru de bactériémies à pneumocoques, les patients splénectomisés doivent recevoir une antibioprophylaxie préventive.
- Pour les déficits de l'adhérence leucocytaire, une greffe de moelle osseuse peut être une fois de plus réalisée avec succès (en dehors des traitements prophylactiques antibiotiques ou antifongiques classiquement proposés).
Mais la thérapie génique constitue la thérapeutique d'avenir (remplacement de la sous-unité CD18 dans les cellules précurseurs myéloïdes) car une efficacité de transfection comprise entre 5 et 10 % suffit pour rendre modérées les manifestations cliniques de la maladie.
- Dans la granulomatose septique, le traitement de base associe le Bactrim® à un antifongique, l'itraconazole en prophylaxie. L'utilité de l'IFN gamma a été discutée : elle permettrait de potentialiser d'autres voies bactéricides du polynucléaire neutrophile. La transfusion de polynucléaires neutrophiles allogéniques a un effet transitoire mais peut être utile. La greffe de moelle osseuse est efficace. Des essais cliniques de thérapie génique sont en cours.
- Enfin, une antibioprophylaxie reste un traitement de choix dans certaines pathologies : c'est le cas du syndrome de Job, pour lequel une éventuelle greffe de moelle osseuse ne sera envisagée que dans les cas graves, après que d'autres traitements plus spécifiques tels que l'administration d'IFN gamma, d'immunoglobulines intraveineuses ou de cromoglycate de sodium ont été proposés.
Pour le syndrome de Chediak-Higashi, un traitement prophylactique au Bactrim® s'associe souvent à une greffe de moelle.
- Dans le cas particulier de l'œdème angioneurotique, la prophylaxie repose sur l'administration de danazol, à court terme, avant un geste chirurgical susceptible de déclencher une crise, ou à long terme si le nombre de crises est d'au moins 1 fois par mois sur 6 mois. Ce dérivé de la testostérone augmente en effet la synthèse hépatique de C1 inh. Le traitement des crises repose sur l'administration intraveineuse de concentrés de C1 inh purifié.

Conclusion

Les déficits immunitaires primitifs constituent un groupe hétérogène de pathologies rares, dont l'étude a permis l'identification d'un certain nombre de mécanismes moléculaires et qui ouvre la voie vers de nouveaux traitements, en particulier la thérapie génique.

L'essentiel de la question

Les déficits immunitaires congénitaux incluent un ensemble de maladies rares et sévères, associées à des mécanismes physiopathologiques variés. La plupart des anomalies décrites affectent la lignée lymphoïde. C'est le cas des déficits immunitaires combinés sévères dans lesquels les lignées T, parfois B et NK peuvent être totalement absentes, et qui représentent une urgence pédiatrique.
Dans ce groupe, d'autres déficits immunitaires plus ou moins graves comprennent, entre autres, des défauts de différenciation des lymphocytes B, des anomalies fonctionnelles des lymphocytes T et des anomalies des cytokines et récepteurs.
Les déficits de la lignée myéloïde et de la voie du complément sont également associés à des tableaux cliniques de gravité variable.
Les manifestations cliniques infectieuses précoces et à répétition constituent un signe d'appel pour l'identification de ces déficits. Alors que les défauts du système à médiation cellulaire sont associés à une sensibilité accrue aux infections par les virus, les protozoaires, les champignons et les pathogènes intracellulaires, les défauts du système humoral sont essentiellement associés à des infections par des bactéries encapsulées, et les déficits de la fonction phagocytaire et du complément plus limités aux infections bactériennes.
La recherche diagnostique comprend en première intention la numération formule sanguine, le dosage pondéral des immunoglobulines, le phénotypage des lymphocytes circulants, l'étude fonctionnelle des polynucléaires et le dosage de l'activité hémolytique du complément. Enfin, une étude familiale, voire un diagnostic prénatal, peut être proposée si l'anomalie génétique est identifiée.
Si la transplantation de cellules souches hématopoïétiques HLA identiques offre un maximum d'efficacité dans les DICS, elle n'est pas toujours réalisable. C'est la raison pour laquelle, dans les cas où les traitements substitutifs ou l'antibioprophylaxie sont insuffisants, tous les espoirs se tournent vers le développement de protocoles de thérapie génique.

Pour en savoir plus

- Buckley R.-H. Primary cellular immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2002 ; 109 : 747-57.
- Candotti F., Notarangelo L., Visconti R., O'Shea J. Molecular aspects of primary immunodeficiencies : lessons from cytokine and other signaling pathways. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 1261-9.
- Chollet-Martin S., Gougerot-Pocidalo M.-A. Déficits héréditaires des polynucléaires neutrophiles. *Transfus Clin Biol* 2000 ; 7 (6) : 533-9.
- Dragon-Durey M.-A., Fremeaux-Bacchi V. Complement component deficiencies in human disease. *Presse Med* 2006 ; 35 (5 Pt 2) : 861-70.
- Fischer A., Hacein-Bey-Abina S., Cavazzana-Calvo M. Gene therapy for immunodeficiency diseases. *Semin Hematol* 2004 ; 41 (4) : 272-8.
- Le Deist F. Exploration d'un déficit héréditaire. John Libbey, *Médecine thérapeutique* 1998 ; 3 : 231-38.
- Lewis M.-J, Botto M. Complement deficiencies in humans and animals : links to autoimmunity. *Autoimmunity* 2006 ; 39 (5) : 367-78.
- Weiss L. Biologie des déficits en compléments. John Libbey, *Médecine thérapeutique* 2000 ; 6 : 155-61.

Bactériologie

Diarrhées infectieuses et bactéries entérotoxinogènes

B. JOLY, Laboratoire de bactériologie, CHRU, Clermont-Ferrand.
A. COLLIGNON, Laboratoire de microbiologie, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry (révision 2007)

Les diarrhées aqueuses se caractérisent par un état de déperdition fécale qui s'accompagne rapidement d'une déshydratation majeure et dont la symptomatologie type est le choléra. Les selles très fréquentes sont aqueuses, très abondantes (perte hydrique jusqu'à 15 ou 20 L/24 h chez l'adulte), sans glaire ni sang. Les vomissements sont fréquents, la fièvre est peu élevée ou absente, les douleurs abdominales sont généralement peu marquées.

I. Physiopathologie

A. Rappel physiologique

1. Histologie de l'intestin

La muqueuse intestinale est essentiellement constituée d'entérocytes qui jouent un rôle prépondérant dans l'absorption des nutriments, notamment de l'eau et des électrolytes. Elle présente une surface de contact considérable avec le contenu intestinal grâce à des dispositifs anatomiques d'amplification (villosités, microvillosités, bordure en brosse). Elle repose sur un chorion muqueux riche en capillaires sanguins et en tissu lymphoïde diffus dans lequel les follicules lymphoïdes s'organisent par endroits en formations lymphoïdes bien individualisées, notamment au niveau des plaques de Peyer et de l'appendice. Ce tissu lymphoïde est drainé par des vaisseaux lymphatiques vers les ganglions mésentériques, puis le canal thoracique et le sang. Cette couche muqueuse est recouverte de plusieurs couches musculaires et l'ensemble est soutenu par une séreuse péritonéale.

2. Eau et intestin

L'homme ingère journellement une quantité d'eau importante (qui représente près de la moitié des liquides extracellulaires de l'organisme), dont la majeure partie est absorbée principalement au niveau du jéjunum et de l'iléon, et en quantité plus faible au niveau du côlon. L'absorption intestinale de l'eau est un phénomène passif lié aux mécanismes mis en jeu pour celle du sodium.
Au cours d'une diarrhée, le mouvement de l'eau suit celui du sodium et implique deux mécanismes qui peuvent exister isolément ou coexister :

- l'inhibition de l'absorption du sodium et de l'eau ;
- la sécrétion accrue du sodium, des bicarbonates, des chlorures et de l'eau.

Sur le plan biochimique, il s'agit surtout d'une production accrue d'AMP cyclique, soit par suite de l'action d'une entérotoxine sur l'adénylcyclase, soit par suite de la production de prostaglandines au cours de la réaction inflammatoire.

3. Flore bactérienne intestinale

La densité microbienne croît de l'estomac au gros intestin. La flore gastrique est très faible du fait des sucs gastriques et du pH acide. Le duodénum est généralement stérile sauf en cas d'achlorhydrie. L'intestin grêle contient une flore pauvre et peu diversifiée. L'iléon héberge une flore provenant du gros intestin (flore de

reflux) constituée de germes aérobies (les anaérobies s'y développent mal). Le côlon ou gros intestin contient une flore très variée et très abondante dont le rôle est important : dégradation des aliments, production de nutriments (vitamines…), stimulation de l'immunité et effet barrière vis-à-vis des bactéries entéropathogènes. *La flore fécale normale* est constituée de 10^{12} bactéries par gramme qui proviennent presque exclusivement du gros intestin.
Cette flore est classiquement formée de deux populations bactériennes :

- la population « résidente », qui est composée d'espèces présentes de façon constante. Il s'agit de bactéries aérobies qui constituent la flore sous-dominante (*Escherichia coli* et autres entérobactéries, entérocoques) et de bactéries anaérobies stricts qui constituent la flore dominante (*Bacteroïdes, Bifidobacterium* et autres anaérobies) ;
- la population « en transit », qui provient de certaines régions du corps, ou de l'environnement (alimentation). Les bactéries appartenant à cette population sont des staphylocoques, divers *Bacillus*, les *Pseudomonas* et autres bacilles à Gram négatif aérobies.

Chez l'adulte et l'enfant et lorsque l'alimentation est constante, la variété de la flore (microbisme intestinal) devient stable : état d'équilibre entre les bactéries à Gram positif (30 à 40 %) et les bactéries à Gram négatif (60 à 70 %) parmi lesquelles les anaérobies stricts sont majoritaires.
Ce microbisme normal ou « eumicrobisme » peut être perturbé du fait de l'introduction de bactéries étrangères pathogènes ou du fait d'un déséquilibre ou « dysmicrobisme ». En effet, certaines bactéries normalement présentes en petite quantité peuvent proliférer sous l'influence de divers facteurs au nombre desquels on trouve principalement l'alimentation et les thérapeutiques antibactériennes.

B. Mécanisme de la diarrhée aqueuse

Les bactéries responsables du syndrome cholériforme peuvent coloniser les parties hautes de l'intestin (duodénum, jéjunum), elles ne sont pas capables d'envahir la muqueuse et de passer dans le sang. Elles se fixent à la surface des entérocytes sur les microvillosités grâce à des facteurs d'adhésion (adhésines). Cette fixation ne provoque pas de lésion ni de trouble de l'absorption.
Les bactéries fixées produisent une toxine protéique (*entérotoxine*) qui après internalisation, dans l'entérocyte stimule la sécrétion d'eau et des électrolytes (effet cytotonique) par les entérocytes dans la lumière intestinale.
Le modèle est celui de *Vibrio cholerae*.
V. cholerae s'attache spécifiquement à la surface de l'épithélium de l'intestin grêle (grâce à l'adhésine) où il prolifère sans léser la structure de l'entérocyte et sans provoquer de lésions inflammatoires. Il libère à ce niveau sa toxine qui va pénétrer dans l'entérocyte et entraîner une fuite hydro-électrolytique massive. Ce liquide ne peut être réabsorbé au niveau du côlon et il en résulte une diarrhée avec pertes liquidiennes très importantes.
La toxine cholérique est une protéine thermolabile de 84 kDa, constituée de deux sous-unités (A et B). La sous-unité A (28 kDa) porte l'activité, elle est constituée de deux fragments (A1 et A2) reliés par un pont disulfure. La sous-unité B est composée de 5 fragments, elle permet l'attachement spécifique de la toxine au ganglioside

GM1. La fixation de la sous-unité B créé une voie de pénétration de la sous-unité A à travers la membrane de l'entérocyte. La fraction A1 de la toxine (fraction active) active l'adénylcyclase en permanence, ce qui entraîne une surproduction d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) à partir de l'ATP (adénosine triphosphate) et son accumulation dans l'entérocyte. Le mécanisme de transport ionique est modifié : sécrétion d'ions chlorure (Cl^-), de bicarbonates $NaHCO_3^-$ et d'eau (qui est entraînée passivement), et inhibition de l'absorption de l'ion sodium (Na^+).

II. Bactéries responsables

A. *Vibrio cholerae*

Vivrio cholerae est un bacille à Gram négatif dont les principaux caractères sont donnés dans le *tableau 1*.

Tableau 1. Caractères bactériologiques principaux de *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli*

	V. cholerae	E. coli
Forme du bacille	Virgule	Droit
Mobilité	+ (polaire)	+ (péritriche)
Fermentation du glucose	+	+
Oxydase	+	–
Indole	+	+
L-arabinose	–	...
D-mannose	+	...
Saccharose	+	...
Sensibilité à 0129*	+	–
Croissance en eau peptonée alcaline (pH 9)	+	–

*Composé vibriostatique

La contamination est oro-fécale. La dose infectante est élevée (10^6 à 10^8 bactéries). L'incubation varie de quelques heures à 5 jours, la diarrhée hydrique « riziforme » (aspect eau de riz) survient brutalement. Elle est continue (jusqu'à 1 litre par heure) et accompagnée de vomissements et de douleurs abdominales. L'intense déshydratation nécessite une réhydratation parentérale. Il y a peu ou pas de fièvre.

B. *Escherichia coli* entérotoxinogène (ETEC)

Des souches d'*E. coli* n'appartenant pas au pathovar entéropathogène (EPEC) ou invasif (EIEC) sont isolées dans les pays tropicaux lors d'épidémies de diarrhées infantiles, et chez des voyageurs lors d'épisodes diarrhéiques de sévérité modérée ou de syndromes très proches du choléra (turista). La contamination est oro-fécale.

Ces *E. coli* ont la capacité de se fixer lors du transit sur toute la hauteur du grêle grâce à des adhésines spécifiques et de produire une entérotoxine. Il s'agit surtout de l'entérotoxine LT (protéine thermolabile), dont la structure et le mode d'action sont très proches de celle de la toxine de V. *cholerae*. Les ETEC peuvent aussi produire l'entérotoxine ST (thermostable) dont l'effet est très limité sur le métabolisme de l'eau chez l'homme.
Le tableau clinique habituel est une diarrhée aqueuse modérée (4 à 5 selles par jour) sans fièvre et où les vomissements et les douleurs abdominales sont inconstants. La guérison est spontanée en 2 ou 3 jours. Cependant, des formes plus sévères sont possibles.

C. Germes entérotoxinogènes responsables d'intoxications alimentaires

1. Staphylocoques dorés entérotoxinogènes

La toxine est produite dans l'aliment, lui-même contaminé par un *Staphylococcus aureus* toxinogène provenant d'un porteur (cuisinier…) symptomatique ou asymptomatique. Il s'agit donc d'une intoxication (plus précisément d'une « intoxination »).
L'incubation est très courte (entre 1 et 6 heures) ; la diarrhée, due à l'entérotoxine sécrétée dans l'aliment avant d'être ingéré, peut entraîner une déshydratation importante. Il n'y a pas de fièvre. L'évolution est spontanée.

2. Clostridium perfringens

Ce bacille à Gram positif anaérobie strict peut être responsable d'une toxi-infection généralement due à l'ingestion de viandes peu cuites, préparées à l'avance et consommées ultérieurement. La diarrhée est peu spécifique.

3. Bacillus cereus

C'est un bacille à Gram positif, sporulé, aérobie-anaérobie facultatif, ubiquitaire. La toxine est préformée dans l'aliment (viandes précuites, riz…) préparé à l'avance. L'incubation peut donc être très courte. Le tableau clinique est peu spécifique.

D. *Clostridium difficile*

C'est un bacille à Gram positif, anaérobie strict. Certaines souches produisent deux toxines : toxine A qui est une entérotoxine et toxine B qui est une cytotoxine.
Lors d'un déséquilibre de l'écosystème bactérien au niveau du côlon et perturbation de l'effet barrière (provoqué généralement par une antibiothérapie), cette bactérie est capable de proliférer et de produire les toxines en grande quantité.
Dans 90 % des cas, les manifestations cliniques sont celles d'une diarrhée banale qui survient pendant ou après l'antibiothérapie. Dans 10 % des cas, la diarrhée se complique d'une colite pseudo-membraneuse parfois mortelle.

E. Autres bactéries entérotoxinogènes

Tableau 2. Micro-organismes capables d'élaborer une ou plusieurs entérotoxines

Micro-organisme	Toxine élaborée	Lieu de sécrétion
Vibrio cholerae	Toxine choléragène	Sécrétion *in situ*
Eschericha coli (ETEC)	Entérotoxines LT et ST	Sécrétion *in situ*
Staphylococcus aureus	Entérotoxines (en particulier entérotoxine A)	Sécrétion dans l'aliment Ingestion de la toxine préformée
Clostridium perfringens	Entérotoxine (36 kDa)	Sécrétion dans l'aliment
Clostridium difficile	Toxines A et B	Sécrétion *in situ*
Bacillus. cereus	Complexe entérotoxique	Sécrétion dans l'aliment
Vibrio parahaemolyticus	Entérotoxine	Sécrétion *in situ*
Aeromonas hydrophila	Entérotoxine	Sécrétion *in situ*

III. Diagnostic

A. Diagnostic clinique

1. Orientation étiologique

- *Notion d'un voyage récent* et de courte durée notamment en pays tropical, qui évoque une « diarrhée du voyageur ». Se déclenchant entre 7 et 10 jours après le début du séjour, elle est généralement bénigne et due dans près de 60 % des cas identifiés à un ETEC (*E. coli* entérotoxinogène). Il peut s'agir du choléra au retour d'un pays d'endémie ;
- *Prise récente d'antibiotiques* (bêtalactamines, clindamycine, fluoroquinolones...). Il peut s'agir alors de *Clostridium difficile* ;
- *Prise récente d'aliments suspects* (viandes peu cuites, pâtisseries, laits non pasteurisés...) et autres cas de diarrhée dans l'entourage. Il s'agit alors d'une TIAC (toxi-infection alimentaire collective) due notamment à *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, ou *Bacillus cereus*.

2. Signes cliniques

- *Signes classiques du syndrome chólériforme* : association d'une diarrhée aqueuse (sans leucocytes ni sang) à des vomissements, des douleurs abdominales peu marquées ; fièvre faible ou absente ;
- *Signes de gravité* : déshydratation sévère (notamment chez le nourrisson et le sujet âgé) ; vomissements importants qui accentuent la déshydratation et perturbent la réhydratation orale ; signes généraux ; diarrhée prolongée.

B. Diagnostic biologique

1. Examen microbiologique des selles : coproculture

Les selles doivent être envoyées rapidement au laboratoire accompagnées des renseignements cliniques les plus précis possible (rôle de la coopération entre le clinicien et le biologiste).

a) Aspect macroscopique : selle liquide, incolore ou « eau de riz »

b) Examen direct

• État frais

Recherche des bactéries mobiles (*V. cholerae*…) et des parasites.

• Coloration de Gram

Étude de l'ensemble de la flore, recherche de germes ayant une morphologie particulière (*V. cholerae*…).

• Coloration cytologique (bleu de méthylène, Giemsa…) : recherche de leucocytes.

c) Cultures

Deux types de milieux sont utilisés :

• Milieux d'enrichissement

Ils favorisent la croissance de germes peu abondants au sein d'une flore abondante et variée (cas de V. *cholerae*, *C. perfringens*, C. *difficile*…) ;

• Milieux d'isolement

Généralement, ils sont sélectifs (présence d'inhibiteurs réduisant la croissance de la flore commensale) et différentiels (mise en évidence de caractères biochimiques caractéristiques de la bactérie recherchée, exemple du lactose).

L'isolement est suivi de l'identification par des méthodes biochimiques ou de biologie moléculaire et éventuellement d'un sérotypage et d'un antibiogramme.

d) Recherche de toxine dans les selles ou dans un aliment

• Méthodes utilisant les cultures cellulaires

Trois types de cellules peuvent être utilisés pour le dépistage de la toxine LT des colibacilles entérotoxinogènes ou de la toxine choléragène. Il s'agit des cellules Y1, des cellules CHO ou des cellules Vero qui subissent un effet cytopathogène sous l'effet de la toxine ; cet effet peut être neutralisé avec l'antitoxine, ce qui permet d'identifier la toxine ;

• Méthodes immunologiques

Elles sont possibles dès lors que l'on dispose des anticorps spécifiques correspondants.

• Méthodes moléculaires

Mise en évidence des gènes codant les toxines par PCR. Ces méthodes sont en plein développement.

2. Autres examens

Recherche des signes biologiques de déshydratation (hématocrite, protidémie, natrémie, fonction rénale…) ou de troubles hydro-électrolytiques (acidose métabolique, hypokaliémie…).

3. Diagnostic bactériologique du choléra

Les selles sont « eau de riz » et, à l'examen direct à l'état frais, on observe des bacilles incurvés très mobiles, surtout au voisinage d'une bulle d'air (germe aérobie préférentiel).
La coproculture est réalisée avec un milieu d'enrichissement (eau peptonée hypersalée à pH alcalin), un milieu d'isolement : gélose alcaline à pH 9 ou un milieu TCBS (thiosulfate de sodium – citrate de sodium – bile de bœuf – saccharose) sur lequel les colonies suspectes sont jaunes (saccharose utilisé) ou vertes (saccharose non utilisé).
L'agglutination sur lame par le sérum anti-01 ou anti-0139 confirme l'identification et l'appartenance au sérogroupe 01 ou 0139 ; la détermination du sérotype (Inaba, Ogawa ou Hikojima) est réalisée à l'aide de sérums monovalents spécifiques.
La souche sera transmise à un centre de référence.

4. Diagnostic des infections à *C. difficile*

Le diagnostic repose sur la recherche de la bactérie d'une part et de ses toxines A et/ou B d'autre part.
Des milieux sélectifs contenant de la cyclosérine et de la cefoxitine sont utilisés (milieu CCFA : cyclosérine cefoxitine fructose agar, ou milieu de George). Après ensemencement, les milieux sont incubés 48 heures en atmosphère anaérobie stricte. Les colonies de *C. difficile* sont étoilées avec un aspect de verre fritté et fluorescent en jaune chartreuse sous les UV.
La toxine B ou cytotoxine peut être recherchée par son effet cytopathogène sous culture cellulaire. Cependant, les méthodes les plus utilisées sont immuno-enzymatiques et permettent de détecter la toxine A et B.
Des méthodes moléculaires par PCR se développent. Seules les souches toxinogènes sont pathogènes.

IV. Traitement

A. Réhydratation

- Par voie orale en l'absence de vomissements et si la déshydratation n'excède pas 10 % du poids du corps, sinon par voie parentérale ;
- Solutés de réhydratation dont la formule de base préconisée par l'OMS est la suivante :
- 3,5 g de NaCL, 1,5 g de KCl, 2,5 g de $NaHCO_3^-$ et 20 g de glucose pour 1 litre d'eau.

B. Régime

Sont préconisés l'arrêt des produits laitiers, des légumes verts et des fruits (sauf les bananes, les pommes et les coings) pendant la phase aiguë et l'utilisation d'aliments de lest (riz, carottes...).

C. Ralentisseurs du transit intestinal et antisécrétoires

Ils diminuent le nombre de selles et les douleurs abdominales. On utilise un ralentisseur de la motricité intestinale tel que le lopéramide (Imodium®), ou un antisécrétoire tel que le racécadotril (Tiorfan®).
Ils sont interdits chez le nourrisson et certains sont contre-indiqués chez l'enfant. Ils sont contre-indiqués dans les infections à *C. difficile*.

D. Antibiothérapie

Elle est indiquée dans le cas du choléra où l'on utilise une fluoroquinolone, le cotrimoxazole (Bactrim®…) ou une tétracycline, et des infections liées à *C. difficile* où l'on utilise le métronidazole ou la vancomycine après arrêt si possible de l'antibiothérapie à l'origine de l'infection.

V. Prophylaxie

- Hygiène alimentaire pour prévenir les TIAC ;
- Amélioration du niveau d'hygiène collectif et précautions d'hygiène individuelles pour le voyageur ;
- Vaccination : la seule utilisable actuellement est la vaccination anticholérique, en particulier vaccination des enfants dans les pays d'endémie. Le vaccin actuel sous-cutané, constitué des bactéries entières tuées par le phénol, confère une protection insuffisante. Des vaccins oraux sont à l'étude : vaccin inactivé constitué de bactéries tuées et de la sous-unité B de la toxine, vaccin « vivant » contenant une souche délestée des gènes de la sous-unité A de la toxine.

L'essentiel de la question

Les diarrhées aqueuses se caractérisent par des *selles liquides* fréquentes et abondantes et une fièvre modérée ou l'absence de fièvre. La diarrhée peut s'accompagner de vomissements, les douleurs abdominales sont généralement peu marquées.
La perte hydrique peut atteindre 20 mL/kg/24 h avec excrétion des bicarbonates (entre 15 et 20 mEq/L), du potassium et des chlorures (20 à 50 mEq/L) et avec absence de résorption du sodium (qui se traduit par une déperdition de 50 à 150 mEq/L). La réhydratation rapide est donc nécessaire, en particulier chez le nourrisson. Le soluté de réhydratation standard contient : 3,5 g de NaCl, 1,5 g de KCl, 2,5 g de $NaHCO_3^-$ et 20 g de glucose (composition pour 1 litre d'eau). La déshydratation peut se compliquer de collapsus, oligurie, insuffisance rénale.
Les germes responsables sont des bactéries qui ont les propriétés suivantes : d'une part, elles se fixent sur l'épithélium digestif au sommet des microvillosités entérocytaires (grâce à des facteurs d'adhésion spécifiques) sans provoquer de lésions et d'autre part, *elles sécrètent une entérotoxine* qui stimule une sécrétion d'eau et d'électrolytes par les entérocytes.

Trois bactéries sont principalement responsables : *Vibrio cholerae*, agent du choléra ; *Escherichia coli* entérotoxinogène (ETEC), responsable de la « turista » et de diarrhées infantiles dans les pays tropicaux ; *Staphylococcus aureus* entérotoxinogène, responsable de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC).
Le diagnostic d'un syndrome cholériforme est clinique et biologique. Le diagnostic biologique repose sur *la coproculture*. L'aspect des selles est évocateur (selles liquides, incolores, ou « eau de riz »), ainsi que l'état frais dans le cas du choléra. Les cultures nécessitent des milieux d'enrichissement et d'isolement adaptés à chaque germe. La recherche de toxine dans les selles est nécessaire dans le cas de *Clostridium difficile* et de *Escherichia coli* entérotoxinogène et peut être réalisée par des méthodes immuno-enzymatiques ou moléculaires.

Pour en savoir plus

- Pilly E. *Maladies infectieuses et tropicales*, 2M2, 17[e] édition, 2000.
- Rambaud J.-C., Rampal P. « Diarrhées aiguës infectieuses » in *Progrès en hépato-gastro-entérologie*. Doin éditeur, Paris 1993.
- SFM. Rémic, Référentiel en microbiologie médicale, 2004.
- Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. *Précis de bactériologie clinique*. Éditions Eska, Paris, 2007.

Diarrhées infectieuses et micro-organismes entéro-invasifs

B. JOLY, Laboratoire de bactériologie, CHRU, Clermont-Ferrand.
A. COLLIGNON, Laboratoire de microbiologie, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry (révision 2007)

Les diarrhées infectieuses de type invasif se caractérisent par des selles glaireuses, mucopurulentes ou sanglantes, des douleurs abdominales au niveau du côlon avec épreintes (douleurs vives) et ténesme (constriction douloureuse du sphincter anal), et une fièvre élevée (39 °C/40 °C). La symptomatologie type est celle de l'infection due aux bactéries du genre Shigella. Elle est provoquée par des micro-organismes variés : bactéries entéro-invasives et des parasites comme les amibes.

I. Physiopathologie

A. Rappel physiologique

Cf. « Diarrhées infectieuses et bactéries entérotoxinogènes ».

B. Mécanismes de la diarrhée invasive

Le processus fondamental est *l'invasion* de la muqueuse digestive et son altération, ce qui entraîne des troubles de l'absorption.
La première étape est la fixation à la surface de la muqueuse digestive au niveau des entérocytes et des cellules M. Elle est observée seulement chez certaines bactéries et elle est transitoire.
L'étape fondamentale est l'invasion de l'épithélium intestinal.
Ce phénomène présente plusieurs modalités suivant le micro-organisme en cause.

- Cas des bactéries, deux modalités :
  - Multiplication dans les entérocytes et les cellules M aboutissant à une ulcération de la muqueuse avec destruction des microvillosités, et à une réaction inflammatoire. C'est notamment le cas des *Shigella* et des *Escherichia coli* entéro-invasifs (ECEI) ;
  - Traversée intracellulaire de l'épithélium au sein d'une vacuole de phagocytose et prise en charge par les macrophages résidants du tissu cellulaire sous-épithélial. C'est le cas des *Salmonella*.
- Cas de *Entamoeba histolytica* (*cf.* parasitologie).

II. Bactéries responsables

A. Shigelles

Entérobactéries dont l'homme est le seul réservoir, les shigelles sont fréquentes dans les pays en voie de développement. Dans les pays où le niveau de vie est élevé, il existe de rares cas familiaux souvent importés. La contamination est oro-fécale. Leur manifestation clinique est la « dysenterie bacillaire » qui est le modèle de la diarrhée invasive. L'incubation est comprise entre 2 et 4 jours, la diarrhée glaireuse et sanglante s'accompagne de douleurs abdominales très fortes, d'épreintes et de ténesme et d'une fièvre élevée (39 °C/40 °C). Parmi les quatre espèces de *Shigella* (*S. dysenteriae, S. flexneri, S. boydii et S. sonnei*), *S. dysenteriae* et à un

degré moindre *S. flexneri* sont les plus pathogènes et peuvent entraîner des formes sévères avec manifestations intestinales très fortes et manifestations neurologiques (troubles du comportement, convulsions...).
Leur pouvoir pathogène est dominé par la capacité d'envahir l'épithélium colique et rectal et d'induire une intense réaction inflammatoire de la muqueuse. Le mécanisme de ce pouvoir pathogène est étudié chez *S. flexneri*. Les facteurs nécessaires à l'invasion sont codés par un plasmide de 220 kb. L'entrée dans la cellule se fait par un processus de macropinocytose. La vacuole d'endocytose est lysée par des protéines bactériennes et la bactérie libérée dans le cytoplasme se multiplie rapidement. La bactérie acquiert aussi la capacité de se mouvoir dans le cytoplasme cellulaire grâce à la production d'une protéine de 120 kb appelée ICSA. Cette protéine induit la polymérisation de l'actine à un pôle de la bactérie (comète d'actine filamenteuse), ce qui entraîne sa propulsion intracytoplasmique et même son passage dans une cellule adjacente ou sa sortie de la cellule au niveau du pôle basal.
L'infection expérimentale chez le singe montre que l'entrée initiale de la bactérie se fait au niveau des follicules lymphoïdes associés à la muqueuse et particulièrement des cellules M. Il se créé à ce niveau une réaction inflammatoire due à l'apoptose induite par la bactérie des macrophages infectés, présents dans les follicules lymphoïdes. Ces macrophages libèrent des cytokines pro-inflammatoires, dont 1L-1β, qui entraînent la migration des polynucléaires et l'ouverture des jonctions intracellulaires, ce qui permet aux bactéries d'accéder à la surface basolatérale des entérocytes, et donc au processus d'invasion de s'amplifier.
Une seconde composante du pouvoir pathogène des shigelles est la production d'une toxine cytotoxique. Cette toxine est synthétisée à un taux important seulement par *S. dysenteriae* sérovar 1 (bacille de Shiga). C'est la raison pour laquelle elle est appelée « shiga toxine » (ST). C'est une N-glycosidase qui agit sur l'ARN ribosomal et entraîne le blocage de la synthèse des protéines.
Cette action au niveau moléculaire se traduit sur le plan anatomique par une destruction des capillaires intestinaux et sur le plan clinique par des manifestations ischémiques et hémorragiques.

B. Salmonelles

Les salmonelles sont des entérobactéries qui interagissent avec la muqueuse digestive. Il en existe deux types selon leur pathogénie : les salmonelles typhiques (*Salmonella* sérotype *typhi* et *Salmonella* sérotype *paratyphi*) provoquant des bactériémies (fièvres typhoïdes) qui ne font pas l'objet de cette question, et les salmonelles non typhiques responsables de gastro-entérites. Ces dernières sont ubiquistes et très nombreuses, il existe en effet plus de 2 000 sérotypes dont *S.* sérotype *typhimurium*, *S.* sérotype *enteritidis*, *S.* sérotype *dublin*...
Leur réservoir est l'intestin des animaux domestiques et d'élevage (porteurs sains ou malades), leur dissémination se fait par les excrétas des animaux dans l'environnement et les eaux. La transmission à l'homme a lieu par ingestion d'aliments protéiques d'origine animale (œufs crus, viande, produits lactés non pasteurisés...) contaminés soit d'une manière originelle, soit plus souvent lors de leur préparation.
Sur le plan clinique, l'incubation est courte (entre 10 et 72 heures après ingestion de l'aliment contaminé). La diarrhée est liquide et fétide, elle s'accompagne de

douleurs abdominales, vomissements, d'une fièvre à 38 °C/39 °C et de céphalées. L'évolution est le plus souvent bénigne, comprise entre 4 et 6 jours. Des formes graves sont possibles : syndrome dysentérique sévère ou bactériémies avec localisations extra-digestives chez les sujets fragilisés.
Le pouvoir pathogène des salmonelles ubiquistes s'exerce au niveau de l'intestin grêle distal et du côlon (les études sont réalisées chez *Salmonella* sérotype *typhimurium*). Après une étape d'adhésion à la muqueuse, les bactéries pénètrent dans les cellules en induisant leur phagocytose. À l'inverse des shigelles, elles ne se multiplient pas dans le cytoplasme cellulaire car elles ne peuvent pas lyser la vacuole de phagocytose (les lésions cellulaires sont donc mineures). La bactérie demeure à l'intérieur de sa vacuole et se trouve « transcytée » grâce aux mouvements intracellulaires du pôle apical d'entrée au pôle basolatéral de la cellule par lequel elle est sécrétée dans le tissu sous-épithélial. La bactérie se trouve alors en présence des macrophages résidents de la lamina propria.
Le devenir de la bactérie dans les macrophages, c'est-à-dire sa destruction ou au contraire sa survie et sa dissémination, dépend de facteurs de virulence codés par un plasmide de virulence. Les salmonelles non typhiques sont généralement détruites dans les macrophages et il se créé un processus inflammatoire local, plus ou moins intense suivant la virulence de la souche et la résistance de l'individu.

C. *Escherichia coli*

Trois pathovars de E. *coli* peuvent être responsables de diarrhées invasives. Les EPEC (*E. coli* entéropathogènes), les EIEC (*E. coli* entéro-invasifs) et les EHEC (*E. coli* entérohémorragiques).

1. Les EPEC

Ils sont responsables de diarrhées chez le nourrisson (enfant de moins de 18 mois). Ces diarrhées épidémiques sont devenues rares dans les pays industrialisés étant donné le niveau des mesures d'hygiène contre les maladies infectieuses d'origine oro-fécale.
Les EPEC adhèrent à la bordure en brosse des entérocytes de l'intestin grêle et la détruisent (effacement des microvillosités). Le gène « *eae* », qui code pour une protéine de 14 kDa appelée « intimine », est nécessaire à cette action. Il s'ensuit une diarrhée liquide et fébrile accompagnée de malaises et de vomissements. Les souches d'EPEC appartiennent à 13 sérotypes principaux, faciles à détecter lors des épidémies par sérotypie (par exemple 0111 : B4, 0119 : B6…). La mise en évidence du gène « *eae* » (par PCR par exemple) est nécessaire pour affirmer que la bactérie est un EPEC.

2. Les EIEC

Ils se comportent comme les shigelles. Cependant, la dose infectante est de 10^6 à 10^8 bactéries (environ 10^2 pour les shigelles) et leur fréquence est difficile à estimer étant donné qu'ils ne sont pas recherchés systématiquement lors de syndrome dysentérique chez l'adulte.

3. Les EHEC

Ce sont des colibacilles qui possèdent le gène « *eae* » des EPEC et qui produisent deux cytotoxines appelées VT 1 et VT 2 (vérotoxine) car leur effet cytopathogène *in vitro* est mis en évidence sur des cellules Vero en culture, ou SLT1 et SLT2 (*Shiga like Toxin*), comparables en cela à la toxine produite par les shigelles (en particulier dans le cas de SLT1 qui n'en diffère que par un acide aminé).
Ces bactéries adhèrent à la surface de l'iléon distal, du caecum et du côlon droit. La première description d'un EHEC date de 1977 ; depuis, des cas sporadiques ou épidémiques assez nombreux sont observés surtout chez l'enfant et les sujets de plus de 65 ans. La souche type appartient au sérotype 0157 : H7 ; elle est la plus fréquente mais d'autres sérotypes sont incriminés. La source d'infection est essentiellement alimentaire, notamment la viande crue sous la forme de hamburger et le lait non pasteurisé.
Les EHEC sont responsables dans les cas typiques d'une colite hémorragique qui débute par une diarrhée aqueuse invasive d'une durée de 1 à 2 jours, accompagnée de douleurs violentes. La colite dure entre 3 et 5 jours avec des douleurs abdominales constantes et dans la moitié des cas, des nausées et des vomissements.
Les formes cliniques sont variables : infection asymptomatique, diarrhée banale et plus rarement syndrome urémique et hémolytique (SHU), ou purpura thrombotique thrombocytopénique qui s'observent aux âges extrêmes.

D. *Campylobacter jejuni*

C'est un bacille à Gram négatif de forme incurvée ou hélicoïdale. Il est commensal du tube digestif des animaux (animaux domestiques, volailles, ovins, porcs...) et responsable de toxi-infections alimentaires. Elles se traduisent par une diarrhée de type invasif non différenciable cliniquement des autres diarrhées.
La physiopathologie au niveau du tube digestif est liée au caractère invasif provoquant une inflammation, ainsi qu'à l'action d'une entérotoxine.

Tableau 1. Principales bactéries invasives

Bactéries	Troubles observés
Shigella *E. coli* invasif (EIEC) *Campylobacter jejuni*	Dysenterie
Yersinia enterocolitica *Campylobacter jejuni* *Salmonella*	Entérite
E. coli entéropathogène (EPEC)	Gastro-entérite infantile
E. coli entérohémorragique (EHEC)	Colite hémorragique

E. *Yersinia enterocolitica*

C'est une entérobactérie ubiquitaire présente chez l'homme, les animaux (porc, rongeurs, chats...) et dans l'environnement. La contamination humaine est fécale-

orale par contact direct et surtout par ingestion d'aliments contaminés. Cette dernière est favorisée par la capacité que possède la bactérie de se multiplier à basse température (4 °C).
Sur le plan clinique, l'infection à *Y. enterocolitica* se manifeste classiquement par une diarrhée aiguë liquide accompagnée de fièvre, de douleurs abdominales et parfois de glaires et de sang. L'incubation est longue (entre 4 et 10 jours après le contage), l'évolution est lente (entre 2 et 3 semaines) et généralement spontanément favorable. Les cas sont nettement prédominants chez l'enfant en bas âge.
Les souches virulentes de *Y. enterocolitica* adhèrent au mucus et le traversent, puis se fixent préférentiellement sur les cellules M au niveau de l'iléon terminal et du côlon proximal. Il se forme des micro-abcès au niveau desquels les bactéries pénètrent dans la muqueuse. Ces événements sont sous la dépendance de gènes chromosomiques et plasmidiques (plasmide pYV).

F. Virus

Plusieurs virus sont responsables d'un syndrome dysentérique épidémique surtout chez l'enfant. Ce sont notamment :
- les rotavirus ;
- les calicivirus entériques ;
- les adénovirus non cultivables ;
- le astrovirus ;
- les coronavirus.

1. Rotavirus

Ce sont des virus nus, très résistants (famille des Reoviridae). Ils sont les responsables les plus fréquents des diarrhées épidémiques du nourrisson (surtout en période hivernale). La contamination est oro-fécale, communautaire ou nosocomiale, la tranche d'âge la plus touchée se situe entre 6 mois et 2 ans.
L'incubation est brève (de quelques heures à 2 ou 3 jours), elle est suivie de l'installation brutale d'une gastro-entérite fébrile avec des vomissements mais sans glaires ni sang. Ces troubles peuvent s'accompagner de déshydratation. L'évolution est spontanée, entre 4 et 7 jours.

2. Calicivirus entériques

Ce sont des virus nus parmi lesquels on distingue les virus *Norwalk-like* (NVL) appelés aussi *small round structured virus* (SRSV), et les calicivirus entériques classiques appelés *Sapporo-like virus* (SLV).
Ils sont responsables d'épidémies de gastro-entérites à prédominance hivernale chez l'adulte et l'enfant d'âge scolaire. L'incubation est de l'ordre de 48 heures. La diarrhée est brève (entre 24 et 48 heures) et de faible intensité, des vomissements et des douleurs abdominales sont souvent associés.

III. Diagnostic

A. Diagnostic clinique

1. Orientation étiologique

- Fréquence des diarrhées bactériennes, notamment celles dues aux salmonelles et au genre *Campylobacter*.
- Notion d'un voyage récent en pays tropical qui peut évoquer une shigellose ou une amibiase intestinale.
- Prise récente d'aliments suspects (œufs, coquillages, viandes peu cuites, lait non pasteurisé…) et autres cas dans l'entourage. Ces circonstances évoquent une TIAC dont l'étiologie principale dans ce contexte de diarrhée invasive est une salmonellose.

2. Signes cliniques

- Signes typiques du syndrome dysentérique : association d'une diarrhée glaireuse, mucopurulente et/ou sanglante à des douleurs abdominales au niveau du côlon avec épreintes et ténesme et fièvre élevée.
- Les formes atypiques, notamment l'absence de glaires et de sang, sont fréquentes.

B. Diagnostic biologique

1. Examen microbiologique des selles : coproculture

a) Prélèvements

Les selles sont recueillies ou émises dans un récipient stérile ou très propre.
Chez les nourrissons, il est possible de procéder à un écouvillonnage rectal. Si le prélèvement ne peut être analysé immédiatement, l'échantillon de selles sera maintenu à basse température (+ 4 °C) jusqu'à la mise en route de l'analyse de façon à éviter la prolifération des espèces commensales.

b) Examen macroscopique

Si les selles sont solides ou semi-solides, il faut rechercher la présence de pus, de glaires, de sang.
Si les selles sont liquides, elles peuvent avoir un aspect évocateur : selles afécales avec glaires sanglantes (selles dysentériformes).

c) Examen microscopique direct

Il est réalisé soit sur une suspension en eau physiologique si les selles sont solides ou semi-solides, soit sur une fraction glaireuse et/ou purulente. Il répond à plusieurs objectifs :
- *La recherche* des hématies et des leucocytes est un temps essentiel : leur présence caractérise un processus invasif.

- *La coloration de Gram* peut être utile pour apprécier un déséquilibre de la flore : à l'état normal, on trouve environ 30 ou 40 % de bactéries à Gram positif et 60 ou 70 % de bactéries à Gram négatif. Elle permet aussi de suspecter la présence de *Campylobacter* de forme ondulée, en « S ».
- *L'examen parasitologique* permet le diagnostic de deux parasitoses.
- La détection *d'Entamoeba histolytica* sous forme *histolytica* dans les selles signe une amibiase intestinale aiguë. L'examen immédiat d'un fragment de selles venant d'être émises permet d'observer au mieux les formes végétatives encore vivantes et mobiles et d'en préciser les caractères. Il est bon d'observer les lames sur platine chauffante. Cette recherche, si elle est négative, peut être répétée après réactivation par un purgatif salin, complétée par des techniques de concentration. Enfin, des colorations aident à l'identification des différentes amibes (lugol, MIF, merthiolate, iode, formol…).
- Le diagnostic d'une bilharziose intestinale à *Schistosoma mansoni* se présentant sous forme dysentérique repose sur la mise en évidence des œufs du parasite (140 µm · 60 µm), par examen direct d'un fragment de matière ou de mucosités prélevées à la surface de selles dures, et par les techniques de concentration (MIF-Faust).

d) Cultures

Elles permettent d'isoler et d'identifier les bactéries. L'échantillon est ensemencé sur des milieux de culture appropriés aux germes recherchés.

e) Recherche des salmonelles et des shigelles

Un milieu d'enrichissement est indispensable (bouillon Mueller Kauffmann ou bouillon au sélénite). Il est repiqué sur milieu d'isolement après 3 à 6 heures d'incubation à 37 °C. Ce dernier est sélectif et contient du lactose (gélose *Salmonella-Shigella*, gélose désoxycholate-citrate-lactose, gélose Hektoen…). Les colonies ayant un aspect de colonies d'entérobactérie et lactose négatives sont suspectes. Ces colonies sont repiquées en milieu « urée indole » pour éliminer la possibilité d'un *Proteus* qui est « urée-positive ». Celles qui sont « urée-négatives » sont identifiées par leurs caractères biochimiques grâce aux galeries d'identification (*cf. tableau* 2). Puis elles sont agglutinées avec des sérums anti-O et anti-H pour déterminer le sérotype, dans le cas où il s'agit d'une salmonelle ou dans le cas d'une shigelle avec des sérums spécifiques d'espèce.

Tableau 2. Caractères bactériologiques principaux de *Salmonella*, *Shigella* et de *Escherichia coli*

	Salmonella	Shigella	Escherichia coli
Mobilité	+	–	+
Lactose	–	–	+
β-galactosidase	–	V	+
Indole	–	V	+
Urée	–	–	–

+ : positif ; – : négatif ; V : variable

f) Recherche de *Escherichia coli* (EPEC, EIEC ou EHEC)

L'échantillon de selles est ensemencé sur un milieu sélectif gélosé (type EMB ou Drigalski) et dans le cas de *E. coli* 0157, sur gélose Mac Conkey au sorbitol. Les colonies suspectes sont « lactose-positives » ; elles sont identifiées grâce aux galeries biochimiques à l'espèce E. *coli*.
Il est encore difficile d'identifier le pathovar. En effet, il faut mettre en évidence le (ou les) facteur(s) spécifique(s) du pouvoir pathogène, ce qui n'est pas possible en routine étant donné l'absence de méthodes commercialisées. Dans deux cas cependant la sérotypie peut être utilisée : celui d'une infection due à *E. coli* 0157 : H7 (l'antisérum est commercialisé), celui d'une épidémie de GEI due à un *E. coli* EPEC dont le sérotype a été déterminé (13 antisérums correspondant à 13 sérotypes de souches EPEC ayant provoqué des épidémies sont en effet commercialisés). Actuellement, les gènes codants pour les facteurs de virulence sont mis en évidence par PCR.

g) Recherche de *Campylobacter*

Les selles sont cultivées pendant au moins 48 heures, en micro-aérophilie, à 37 °C sur un milieu gélosé spécial (Campylosel…). Une colorisation de Gram est faite sur les colonies suspectes et visualise des bactéries à Gram négatif en forme de « S ». L'oxydase est positive.

h) Recherche de *Yersinia enterocolitica*

L'échantillon est ensemencé dans un milieu d'enrichissement (milieu de Rappaport) incubé 24 à 48 heures à 4 °C puis repiqué sur un milieu spécifique de *Yersinia*. Les colonies suspectes apparues sur ce milieu sont identifiées.

i) Recherche de virus

Lors de la phase aiguë de la diarrhée, les virus responsables sont présents en grande quantité (10^8 à 10^{12} particules virales par gramme de selles). Leur mise en évidence est donc possible sans culture préalable, trois méthodes principales sont utilisées :
- microscopie électronique et immunomicroscopie électronique ;
- détection d'antigènes viraux : agglutination de particules de latex (cas du rotavirus) ou techniques immunoenzymatiques (rotavirus, adénovirus, astrovirus) ;
- méthodes spécialisées : isolement du virus par culture cellulaire (rotavirus), amplification génique (calicivirus).

2. Autres examens

- Hémoculture, lorsque la diarrhée est accompagnée de fièvre.
- Recherche d'une hyperleucocytose sanguine.
- Recherche de signes biologiques de déshydratation (hématocrite, protidémie, natrémie, fonction rénale…) ou de troubles hydro-électrolytiques (acidose métabolique, hypokaliémie).

3. Conclusion

La coproculture permet donc d'isoler au sein d'une flore complexe (flore digestive) un nombre limité de micro-organismes pathogènes. Cependant, cet examen est

souvent peu efficient en particulier en raison du manque d'informations épidémio-cliniques l'accompagnant.
Il est impératif, pour une bonne orientation des recherches, d'avoir des renseignements au minimum sur les éléments suivants : âge du patient, (en particulier enfant de mois de 2 ans), notion de voyage récent, malade ayant un traitement antibiotique, TIAC, SHU, patient immunodéprimé.

IV. Traitement

Le traitement des diarrhées invasives comprend essentiellement la réhydratation, l'utilisation de médicaments symptomatiques et dans certains cas une antibiothérapie.

A. Réhydratation

Voir « Diarrhées infectieuses et bactéries entérotoxinogènes ».

B. Médicaments symptomatiques

Les ralentisseurs du transit intestinal doivent être employés avec précautions dans les diarrhées invasives dysentériformes et sont contre-indiqués chez le nourrisson et le jeune enfant. En effet, ils freinent l'élimination des germes et peuvent favoriser leur diffusion extra-digestive. Dans les diarrhées modérées non glairo-sanglantes, ils sont utiles pour diminuer le nombre de selles et l'intensité des douleurs abdominales.
Sont utilisés : le lopéramide (Imodium®…), le diphénoxylate (Diarsed®). Les antiscorbutiques, tels que le racécadotril (Tiorfan®), n'ont pas cet inconvénient et ont également une bonne efficacité.
Chez le nourrisson ou le jeune enfant, l'apport de pectines absorbantes (soupe de carottes, caroube…) ou d'eau de riz facilite la réhydratation.

C. Antibiothérapie

Elle est rarement nécessaire sauf pour les infections dues au genre *Shigella*. Elle peut être cependant indiquée pour traiter une diarrhée invasive dans les cas suivants :
- risque de diffusion extra-digestive ;
- lorsqu'elle survient sur un terrain fragilisé : immunodéprimé, nourrisson, personne âgée… ;
- chez la femme enceinte ;
- lors d'une épidémie dans le but de réduire la contagiosité des selles.

On utilise chez l'adulte (sauf chez la femme enceinte) une fluoroquinolone en première intention. Cependant, la possibilité de multirésistance nécessite de faire l'antibiogramme de chaque bactérie responsable de manière à adapter l'antibiothérapie.

V. Prophylaxie

Quel que soit le germe en cause, la contamination est fécale-orale : eau souillée par les matières fécales d'origine humaine ou animale, légumes consommés crus, viandes d'animaux infectées avant ou après l'abattage (mouches, manipulations). La transmission à partir des porteurs de germes humains ou animaux est très souvent manuelle ; l'éclosion d'épidémies relève donc fréquemment d'un manque d'hygiène.

La prévention repose sur l'isolement des malades, la désinfection des déjections, le lavage des mains dans les collectivités et les crèches, et l'hygiène des aliments.

Le dépistage et le traitement des porteurs de germes, en particulier dans l'industrie alimentaire et les cuisines collectives, sont également importants.

L'essentiel de la question

Les diarrhées de type invasif sont caractérisées *par une diarrhée glaireuse, mucopurulente ou sanglante,* des douleurs abdominales siégeant au niveau du côlon accompagnées d'épreintes et de ténesme, et par une fièvre élevée.

Les germes responsables sont capables *d'envahir la muqueuse digestive* au niveau de laquelle s'instaure un processus inflammatoire. La muqueuse est ulcérée, les microvillosités sont détruites, ce qui entraîne des troubles de l'absorption.

Ces phénomènes sont plus ou moins intenses suivant les micro-organismes responsables. *Les bactéries invasives* ont la capacité de se multiplier dans le cytoplasme des entérocytes ou des cellules M et dans les macrophages. Il s'agit d'entérobactéries telles que les shigelles, les salmonelles dites mineures et les *Escherichia coli* invasifs (pathovars EPEC, EIEC et EHEC), *Yersinia enterocolitica* et *Campylobacter jejuni.*

Le principal parasite est *Entamoeba histolytica,* responsable de l'amibiase intestinale.

Le diagnostic est clinique et biologique. Sur le plan biologique, il repose sur la *coproculture.* L'aspect des selles (glaireuses et sanglantes) est évocateur. L'examen microscopique permet d'objectiver l'aspect invasif (présence de leucocytes et d'hématies) et d'identifier le parasite responsable ou certaines bactéries telle que *Campylobacter.* Les bactéries sont isolées et identifiées grâce la mise en culture sur des milieux d'enrichissement et d'isolement adaptés.

Le traitement repose sur la réhydratation. Lors d'une diarrhée bactérienne, *l'antibiothérapie* n'est nécessaire que dans les cas graves ou chez certains patients exposés ; elle sera orientée grâce à l'antibiogramme. Les médicaments ralentissant le transit intestinal doivent être employés avec circonspection, les antisécrétoires sont également efficaces.

La prophylaxie repose essentiellement sur l'hygiène de l'eau et des aliments, en particulier dans les collectivités et lors de voyages dans des pays à risque.

Pour en savoir plus

- Anglaret X., Mortier E. *Maladies infectieuses*, Med Line. Estem 2000-2001.
- Pilly E. *Maladies infectieuses et tropicales*. 2M2, 17e édition, 2000.
- Rambaud J.-C., Rampal P. « Diarrhées aiguës infectieuses » in *Progrès en hépato-gastro-entérologie*. Doin éditeur, Paris 1993.
- SFM. *Rémic, Référentiel en microbiologie médicale*, 2004.
- Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. *Précis de bactériologie clinique*. Éditions Eska, Paris, 2007.

Pneumonies aiguës

I. POILANE, Microbiologie, hôpital Jean Verdier, AP-HP, Bondy.

La pneumonie est une infection des voies respiratoires basses par opposition aux infections des voies respiratoires hautes telles que les pharyngites, trachéites et angines, qui sont plus fréquentes. C'est une infection du parenchyme pulmonaire. On distingue, selon leur mode d'évolution, les pneumonies aiguës et les pneumonies chroniques.

I. Rappel physiopathologique

Venant en second rang après celle de l'appareil digestif, la surface déployée chez l'adulte par l'arbre pulmonaire est estimée à quelque 100 m^2. Le poumon comporte en moyenne 300 millions d'alvéoles et un réseau de capillaires sanguins long de 2 000 km.
Le volume journalier d'air inspiré atteint 10 000 litres. Une telle interface, exposée en permanence à un environnement extérieur hostile, dispose d'un remarquable système intégré de mécanismes destinés à garantir la plénitude fonctionnelle des unités alvéolaires. La faillite ou le dérèglement de ces mécanismes en cas d'agression microbienne conduit à un état infectieux caractérisé.
On comprend ainsi que la structure alvéolaire limitée à une seule assise de cellules pavimenteuses autorise le passage sanguin d'espèces et la généralisation éventuelle de l'infection (bactériémie pneumococcique, méningite tuberculeuse…).

A. Les mécanismes de défense

Les moyens mécaniques en constituent la première ligne. La vitesse du flux aérien, l'épuration mucociliaire et la béance alvéolaire (gage de bonne qualité des échanges gazeux) constituent une barrière contre des pathogènes potentiels. La défaillance de cette barrière s'observe dans le syndrome (rare) des cils immobiles, plus fréquemment au cours de la mucoviscidose caractérisée au niveau pulmonaire par des épisodes infectieux, dès les premiers mois de vie, puis des accès gravissimes.
Les moyens immunologiques associent l'action de diverses immunoglobulines à la phagocytose.
À l'étage supérieur, le rôle principal est dévolu aux IgAs sécrétées de façon prépondérante par les plasmocytes du tissu lymphoïde bronchique. Elles exercent dans le mucus une action de neutralisation des antigènes en fixant en particulier bactéries et virus.
Au niveau alvéolaire, les macrophages ont de multiples fonctions :
- sentinelles, ils déclenchent un état inflammatoire par libération de prostaglandines, IL1, TNF… ;
- bactéricides, ils produisent des radicaux oxygénés et enzymes diverses dont le lysozyme ;
- initiatrices de l'immunité cellulaire, ils transforment les antigènes et les rendent reconnaissables pour les récepteurs lymphocytaires ;
- destructrices de certaines espèces dites intracellulaires (*Mycobacterium*, *Legionella*) avec le concours des lymphocytes T.

Les IgG prédominent à ce niveau. Leur rôle est capital pour assurer une phagocytose efficace.

Les polynucléaires neutrophiles ne représentent que 1 ou 2 % des cellules alvéolaires libres. Mais lorsque ces autres cellules (macrophages, lymphocytes) deviennent incapables de contrôler le développement de l'agent infectieux, essentiellement bactérien, un afflux de polynucléaires neutrophiles se produit.

B. Les mécanismes physiopathologiques

1. Voie de pénétration des germes

Voie aérienne : c'est le mode de contamination le plus important avec propagation le long de l'arbre trachéo-bronchique de bactéries exogènes (pneumocoque, *Hæmophilus sp.*, mycoplasme, légionelle) ou endogènes (commensales de la cavité buccale, du carrefour aérodigestif).
Voie hématogène : elle est rare et peut être observée au cours de septicémies.

2. Altération du drainage trachéo-bronchique

Elle résulte de la destruction de l'épithélium ou d'un obstacle qui rend inefficace l'élimination des germes (bronchite chronique, mucoviscidose, tabagisme…).

3. Inhalation de germes des voies aérodigestives supérieures

Les facteurs favorisants sont la présence d'une sonde gastrique, un coma, une paralysie…

4. Immunodépression

Toutes les immunodépressions, l'alcoolisme, le diabète, la malnutrition, sont des facteurs favorisant les pneumonies infectieuses.

II. Contexte d'acquisition des pneumonies aiguës

Il est d'usage de distinguer les pneumonies aiguës communautaires (PAC) des pneumonies aiguës nosocomiales. Une pneumonie est dite communautaire si elle est acquise en milieu extrahospitalier ou si elle se révèle dans les premières 48 heures d'une hospitalisation. Une pneumonie est dite nosocomiale si elle est acquise à l'hôpital ou si elle se révèle 48 heures après le début de l'hospitalisation.

A. Les pneumonies communautaires

1. Rappel épidémiologique

La prévalence des pneumonies aiguës communautaires est estimée entre 400 000 et 600 000 cas par an en France dont environ 40 % de pneumonies à pneumocoque. Ce sont des infections pouvant être sévères, avec une mortalité comprise entre 10 et 15 %.

2. Diagnostic clinico-radiologique

Le diagnostic des pneumonies aiguës communautaires est difficile. Il repose sur un faisceau d'arguments cliniques et radiologiques. La clinique associe des signes d'infection (fièvre, céphalées, myalgies) et des signes fonctionnels (toux, douleur thoracique, expectorations parfois purulentes, dyspnée). Les signes cliniques sont rarement au complet et chez le sujet âgé, la symptomatologie est souvent trompeuse. Le recours à la radiographie est obligatoire lorsque les signes cliniques évoquent une pneumonie. L'aspect radiologique se traduit par des opacités d'aspect divers. Communément, on décrit les opacités alvéolaires uniques ou multiples, évoluant vers une opacité lobaire. Cet aspect est le plus souvent rapporté dans les formes sévères liées notamment à pneumocoque ou *Hæmophilus sp.* On parle alors de pneumonie franche lobaire ou alvéolaire. Dans ce cas, le début de l'infection est brutal, hyperthermique avec une fièvre > 38 °C.
Parallèlement, on décrit des opacités interstitielles localisées ou diffuses, que l'on observe lors des pneumonies interstitielles, dites atypiques. Le tissu conjonctif interstitiel est ici infecté prioritairement par des agents aussi divers que virus ou bactéries intracellulaires (*Mycoplasma*, *Chlamydia*). Le début de l'infection est progressif, souvent précédé de signes d'infection rhino-pharyngée.
Les signes cliniques sont variables, plus ou moins intenses, et l'aspect radiologique n'est pas toujours caractéristique ce qui rend le diagnostic parfois difficile. De plus, les signes radiologiques peuvent être décalés dans le temps par rapport aux signes cliniques.

3. Principales étiologies

Dans 50 % des cas, l'agent causal, lorsqu'il est recherché, n'est pas identifié et cela pour différentes raisons : antibiothérapie préalable, agent infectieux de culture difficile…
On dénombre 6 agents pathogènes responsables d'environ 80 ou 90 % des pneumonies aiguës communautaires : *Streptococcus pneumoniae* (entre 30 et 50 % des cas), *Hæmophilus influenzae* (entre 5 et 25 % des cas), *Mycoplasma pneumoniae* (entre 7 et 10 % des cas), *Chlamydia pneumoniae* (entre 7 et 10 % des cas), *Legionella pneumophila* (entre 0,5 et 5 % des cas) et le virus grippal.
Les données épidémiologiques varient en fonction de l'âge et du terrain. L'incidence de *Mycoplasma pneumoniae* diminue avec l'âge. Chez l'enfant de moins de 2 ans, les infections sont principalement virales, le Virus respiratoire syncytial (VRS) venant au 1er rang des cas de bronchiolites. Entre 2 et 10 ans, les données épidémiologiques se rapprochent de celles de l'adulte d'âge moyen, les pneumonies à *Hæmophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* et à *Staphylococcus aureus* sont plus fréquentes. Selon le terrain, certains micro-organismes ont un tropisme plus marqué : *Hæmophilus influenzae* chez le bronchitique chronique, *Klebsiella pneumoniae* chez l'éthylique, *Staphylococcus aureus* chez le diabétique et au cours des surinfections grippales.

4. Critères d'hospitalisation

Le choix de la prise en charge ambulatoire ou de l'hospitalisation repose sur différents éléments :
• présence d'un signe de gravité devant conduire à l'hospitalisation d'emblée ;

- existence de situations particulières qui doivent conduire à l'hospitalisation d'emblée ;
- présence de facteurs de risque de mortalité (comorbidité) en cas d'absence de signes de gravité.

Signes de gravité : atteinte des fonctions supérieures (trouble de la conscience), atteinte des fonctions vitales (pression artérielle systolique < 90 mmHg, pouls > 120/min., polypnée : fréquence respiratoire > 30/min.), température < 35 °C ou > 40 °C, pneumonie d'inhalation ou sur obstacle trachéo-bronchique connu ou suspecté.

Situations particulières : conditions socio-économiques défavorables, inobservance thérapeutique, isolement des personnes âgées.

Facteurs de risque de mortalité : âge > 65 ans, maladie néoplasique, maladie hépatique, insuffisance cardiaque congestive, maladie cérébro-vasculaire, maladie rénale.

5. Diagnostic bactériologique

a) Examen cytobactériologique des crachats

Dans les pneumonies communautaires, le prélèvement bactériologique le plus accessible est l'examen cytobactériologique des crachats (ECBC). Cette analyse n'est pas conseillée en systématique. En effet, la connaissance des principaux agents infectieux responsables de pneumonies communautaires permet de mettre en place une antibiothérapie probabiliste.

Néanmoins, correctement effectué chez un patient sans antibiothérapie, l'ECBC a une bonne sensibilité et une bonne spécificité au cours des pneumonies à pneumocoque. Cet examen n'a de pertinence diagnostique que si l'examen direct est positif.

- Recueil de l'expectoration

Il doit se faire le matin, au réveil, après rinçage de la bouche à l'eau distillée stérile et lors de la toux, aidée si nécessaire par la kinésithérapie. L'examen bactériologique doit être effectué sans délai.

- Examen microscopique

Cet examen est indispensable pour confirmer la qualité du prélèvement. Il consiste à examiner l'échantillon soit à l'état frais, soit sur un frottis coloré par la méthode de Gram au microscope à grossissement × 100 pour dénombrer les cellules épithéliales et les leucocytes par champ.

Les résultats de l'examen microscopique permettent de distinguer cinq classes de crachats :

Classe	Cellules par champ		
	Épithéliales	Leucocytes	
1	> 25	< 10	À refaire
2	> 25	Entre 10 et 25	À refaire
3	> 25	> 25	Acceptable
4	Entre 10 et 25	> 25	Acceptable
5	< 10	> 25	Correct

Les crachats de classes 1 et 2 sont fortement contaminés par la salive et ne doivent pas être mis en culture. Un nouveau prélèvement doit être demandé.
Les crachats de classes 3 et 4 ont un nombre de leucocytes qui témoigne d'une réaction inflammatoire mais sont contaminés par la salive.
Les crachats de classe 5 sont les plus appropriés à l'analyse bactériologique.
La coloration de Gram permet d'apprécier la richesse et le monomorphisme de la flore. À ce stade, il est possible de suspecter la présence de pneumocoque ou d'une flore anaérobie.

- Cultures et dénombrement

Après fluidification du prélèvement, on ensemence une dilution appropriée permettant un dénombrement des bactéries au-delà de 10^5 UFC/mL sur différents milieux.
Habituellement, on se limite à l'identification et à l'antibiogramme d'une ou deux espèces bactériennes $\geq 10^7$ UFC/mL.
Dans le cas particulier de la mucoviscidose, le seuil de dénombrement est de 10^2 UFC/mL pour *Burkholderia cepacia* et de 10^5 UFC/mL pour les espèces n'appartenant pas à la flore commensale : bacilles à Gram négatifs type entérobactéries ou non fermentants, y compris *Pseudomonas aeruginosa*, et pour les trois espèces suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Hæmophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae*.

b) Antigène urinaire de *Streptococcus pneumoniae*

C'est un test immuno-enzymatique unitaire qui permet un diagnostic étiologique rapide (15 minutes environ). La sensibilité de ce test varie de 77 à 89 % dans les pneumonies aiguës bactériémiques.

c) Antigène urinaire de *Legionella pneumophila*

Environ 80 % des patients présentant une infection à *Legionella pneumophila* du sérogroupe 1 excrètent dans leurs urines des antigènes. Cette excrétion apparaît entre 1 et 3 jours après le début de la maladie et peut durer 1 an. La détection est réalisée par méthode unitaire immuno-enzymatique. La sensibilité et la spécificité sont respectivement de 86 % et de 93 %.

d) Stratégie diagnostique microbiologique

Pour les pneumonies acquises en ville, il apparaît inutile de proposer un bilan microbiologique pour les patients ayant des critères de gravité faibles.
Pour les patients hospitalisés en dehors de la réanimation :

- les hémocultures et l'ECBC peuvent être recommandés ;
- la détection d'antigènes urinaires à pneumocoque et/ou légionelle n'est pas recommandée d'emblée. Elle peut se justifier chez des patients présentant des symptômes évocateurs de légionellose ou en situation épidémique, ou chez les patients présentant une hypoxémie.

Pour les patients hospitalisés en réanimation, hémocultures, analyse microbiologique des sécrétions trachéo-bronchiques, détection d'antigènes urinaires à pneumocoque et légionelle, sont recommandées.

En absence de réponse clinique (défervescence thermique) entre 48 et 72 heures après le début du traitement, des investigations microbiologiques doivent être effectuées :
- pour chercher à identifier le germe responsable s'il n'est pas connu ;
- pour rechercher une résistance éventuelle ou une surinfection si le germe responsable est connu.

e) Autres recherches spécifiques

Mycoplasma pneumoniae

Le recueil des sécrétions doit être réalisé par brossage endobronchique ou lavage broncho-alvéolaire. La recherche se fait par culture cellulaire ou par méthode d'amplification génique (PCR). Ces techniques étant invasives, on privilégie le diagnostic indirect avec la recherche d'IgG et d'IgM.

Chlamydia pneumoniae et *Chlamydia psittaci*

La recherche peut être réalisée à partir de l'écouvillonnage de l'oropharynx postérieur, par culture cellulaire avec mise en évidence des inclusions par un anticorps spécifique, fluorescent.
Un diagnostic sérologique avec recherche d'IgG et d'IgM est également disponible, soit par méthode immuno-enzymatique, soit par immunofluorescence.

Legionella pneumophila

Outre la détection d'antigènes urinaires, d'autres méthodes sont disponibles.
- Culture : Le prélèvement le mieux adapté et donnant le plus fort taux de positivité est le lavage broncho-alvéolaire. La culture est réalisée sur des milieux spécifiques pendant 10 jours à 37 °C. L'identification de *Legionella pneumophila* est effectuée à l'aide d'antisérums en immunofluorescence ou par agglutination ;
- Détection des légionelles par amplification génique : Une amplification génique par PCR du gène de virulence *mip* peut être réalisée directement sur le prélèvement pulmonaire. Néanmoins, cette méthode ne figure pas actuellement dans la définition des cas de légionellose ;
- Sérodiagnostic : Seule la mise en évidence d'une augmentation du titre des anticorps sur 2 prélèvements à 15 jours d'intervalle permet de confirmer le diagnostic de légionellose. La technique d'immunofluorescence indirecte reste la méthode de référence mais des techniques Elisa sont aussi proposées.

Bordetella pertussis

Le prélèvement le plus adapté pour le diagnostic de la coqueluche est l'aspiration nasopharyngée ou éventuellement l'écouvillonnage nasal. Il doit être le plus précoce possible par rapport au début des signes cliniques et doit être acheminé au laboratoire dans les 30 minutes.
La culture est une méthode délicate, spécifique mais peu sensible. Elle est réalisée sur milieu de Bordet-Gengou. *Bordetella pertussis* se développe entre 2 et 7 jours à 37 °C en aérobiose.
La réaction d'amplification génique par PCR est très utilisée. C'est une méthode sensible et spécifique. Le gène-cible est soit le promoteur du gène de la toxine pertussique, soit la séquence d'insertion IS 481.
Le sérodiagnostic peut être également utilisé pour compléter le diagnostic.

6. Stratégie thérapeutique

Dans tous les cas, le traitement initial d'une pneumonie communautaire reste probabiliste.
L'évolution de la pneumonie dépend de la précocité du traitement.

a) Pneumonie aiguë communautaire non sévère

- Sujets sans comorbidité : amoxicilline 1 g × 3/j ou pristinamycine ou télithromycine ;
- Sujets avec comorbidité : amoxicilline/acide clavulanique 1 g × 3/j ;
- Sujets âgés en institution : amoxicilline/acide clavulanique ou ceftriaxone, ou fluoroquinolone antipneumococcique (FQAP).

Une réévaluation clinique du traitement doit être effectuée à 48 heures ou à 72 heures. Le critère principal d'amélioration clinique est la défervescence thermique. En cas de non-défervescence, sans aggravation clinique après un traitement initial par une bêtalactamine, il est recommandé d'effectuer une substitution :
- sans comorbidité, par macrolide ou pristinamycine, ou télithromycine ;
- avec comorbidité, par une FQAP (lévofloxacine ou moxifloxacine).

b) Pneumonie aiguë communautaire sévère

Un traitement inapproprié peut compromettre le pronostic. Il faut donc choisir de façon probabiliste une antibiothérapie large spectre, après avoir réalisé les investigations à visée étiologique. Ce traitement doit être actif sur les pyogènes, les légionelles et les germes intracellulaires (mycoplasme, chlamydia).
- Sujets jeunes sans comorbidité : céphalosporine de 3e génération associée à un macrolide ou une FQAP ;
- Sujets âgés ou avec comorbidité : céphalosporine de 3e génération associée à une FQAP.

Dans tous les cas, la durée du traitement est comprise entre 7 et 14 jours avec une moyenne de 10 jours. Les nouvelles molécules comme les kétolides ou les FQAP permettent de diminuer cette durée.

B. Les pneumonies nosocomiales

Par définition, ces pneumonies surviennent 48 heures après l'admission dans une structure de soins.

1. Agents infectieux en cause

Les germes responsables varient suivant l'écologie locale. Les bacilles à Gram négatifs représentent non seulement la majorité mais aussi la diversité des situations, avec soit des bacilles non fermentaires (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumanii*), soit des entérobactéries (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia coli*). Parmi les cocci à Gram positifs, *Staphylococcus aureus* est le plus fréquemment retrouvé, suivi des streptocoques.
Certaines de ces bactéries présentent parfois des résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques. Ce sont les bactéries multirésistantes ou BMR.
D'autres agents pathogènes peuvent être décrits : *Legionella pneumophila*, Virus respiratoire syncytial (VRS), notamment chez l'enfant.

2. Facteurs prédisposants, pathogénie

La majorité des pneumopathies nosocomiales surviennent dans les services de réanimation chez des patients sous ventilation mécanique. Le facteur de risque principal est, bien sûr, la présence d'un matériel étranger endotrachéal suivie de l'utilisation d'antibiotiques, la période postopératoire, l'obésité, l'âge avancé…
La contamination exogène (aérosol, matériel de ventilation) est rare depuis que des mesures d'hygiène strictes ont été instaurées dans la maintenance des nébuliseurs et respirateurs.
Legionella pneumophila a été décrite dans des cas de pneumonies nosocomiales dont l'origine de la contamination était le réseau de climatisation.
L'origine endogène est réputée majoritaire chez le patient ventilé, résultant de la colonisation obligée de l'estomac et de l'oropharynx par des espèces d'origine digestive, généralement à Gram négatif, sélectionnées par l'antibiothérapie en usage dans l'unité de soins. La contamination se trouve favorisée par un péristaltisme bronchique déficient, la diminution iatrogène de l'acidité gastrique, le cheminement microbien rétrograde le long de la sonde nasogastrique.

3. Diagnostic bactériologique

Compte tenu de la diversité des agents responsables et de leur résistance aux antibiotiques, l'analyse bactériologique doit permettre d'isoler l'agent étiologique pour adapter l'antibiothérapie et pour faire la distinction entre colonisation des voies aériennes, fréquente chez les patients ventilés, et infection véritable du poumon.

a) Prélèvements

Chez le patient non ventilé, l'analyse bactériologique sera effectuée sur une expectoration (*cf.* pneumonies communautaires) ou sur une aspiration nasopharyngée (en particulier chez l'enfant).
Chez le patient ventilé, les moyens du diagnostic bactériologique reposent sur la qualité de l'échantillon à analyser qui sera obtenu par des méthodes plus ou moins invasives, avec une protection plus ou moins efficace contre la contamination par la flore oropharyngée (prélèvement protégé ou non) et l'utilisation ou non d'un fibroscope.

- Aspiration endotrachéale

  Le recueil des sécrétions est réalisé à l'aide d'un cathéter chez les patients intubés ou trachéotomisés. Le prélèvement est alors contaminé par la flore oropharyngée ;

- Lavage broncho-alvéolaire (LBA)

  Ce prélèvement est réalisé à l'aide d'un fibroscope. On introduit par le canal du fibroscope de l'eau physiologique (50 mL) qui est ensuite aspirée. L'opération est répétée 4 ou 5 fois. On recueille la dernière fraction pour l'analyse bactériologique. Ce prélèvement est potentiellement contaminé par la flore oropharyngée ;

- Brossage distal protégé par la technique de Wimberley (BDP)

  Ce prélèvement est réalisé sous contrôle fibroscopique. Il s'agit d'une brosse en nylon fixée à l'extrémité d'un guide métallique. Brosse et guide coulissent à l'intérieur d'un cathéter lui-même placé à l'intérieur d'un second cathéter obturé par un

bouchon de polyéthylène glycol. Sous contrôle visuel, le cathéter interne est poussé au niveau des bronches, expulsant le bouchon et permettant d'avancer la brosse de quelques centimètres pour réaliser le prélèvement bactériologique protégé.
Ensuite, les manœuvres inverses sont effectuées. La brosse interne est coupée aux ciseaux dans un récipient contenant 1 mL de liquide stérile (eau physiologique, liquide de Ringer) et est acheminée au laboratoire ;

- Ponction pleurale
  Tout épanchement de liquide pleural doit être ponctionné. Les cultures ne sont positives que dans 10 à 15 % des pneumonies nosocomiales, mais elles ont une très bonne valeur prédictive positive.

Tous ces prélèvements doivent être associés à des hémocultures.

b) Examen cytobactériologique

Les prélèvements doivent être acheminés et analysés rapidement au laboratoire pour éviter la multiplication des bactéries commensales et la lyse de certaines bactéries fragiles.

- Examen direct
  Tous ces prélèvements feront l'objet d'un examen direct avec coloration au May-Grünwald-Giemsa pour étudier la cytologie, et coloration de Gram pour étudier la flore bactérienne. Le nombre de cellules infectées dans le LBA (> 2 %) peut orienter vers la présence d'une infection véritable et non d'une colonisation.

- Culture quantitative
  L'échantillon est ensemencé quantitativement sur différents milieux gélosés : gélose au sang en aérobiose et en anaérobiose, gélose sélective pour les bacilles à Gram négatifs, gélose chocolat isovitalex sous 5 % de CO_2, Sabouraud. Ces milieux sont incubés entre 24 et 48 heures à 37 °C.
  Les colonies sont alors dénombrées. Un seuil de 10^3 UFC/mL est considéré comme significatif pour le BDP et de 10^4 UFC/mL pour le LBA.
  L'antibiogramme sera effectué sur chaque espèce trouvée en quantité significative.

4. Stratégie thérapeutique

Le traitement des pneumonies nosocomiales nécessite, dans la majorité des cas, une documentation bactériologique avec isolement de la bactérie responsable et étude de sa sensibilité aux antibiotiques. Cependant, un traitement probabiliste peut être entrepris après réalisation du prélèvement pour l'analyse bactériologique, si l'infection pulmonaire met en jeu le pronostic vital (sujet immunodéprimé, patient en choc septique). Le choix de l'antibiothérapie doit prendre en compte l'écologie locale, les données concernant le patient lui-même (pathologie sous-jacente, autre infection prouvée, hospitalisations antérieures, antibiothérapie déjà en cours) et le résultat de l'examen direct du ou des prélèvements pulmonaires. En fonction de l'écologie locale, de la durée d'hospitalisation du patient avant la pneumonie nosocomiale et d'une antibiothérapie préalable, il faudra envisager des antibiotiques actifs sur les bactéries multirésistantes : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, entérobactéries à bêtalactamase à spectre étendu, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Acinetobacter baumanii* multirésistants.

Conclusion

Les pneumonies aiguës sont des infections fréquentes, de gravité variable.
Le diagnostic des pneumonies bactériennes est difficile et repose sur un ensemble d'arguments : aspects clinique, radiologique et biologique. On distingue les pneumonies aiguës des pneumonies chroniques et au sein des pneumonies aiguës, les pneumonies communautaires ou nosocomiales.
Le traitement est le plus souvent probabiliste. Dans les formes sévères ou nosocomiales, il sera adapté à la sensibilité des bactéries isolées dans les prélèvements bactériologiques.

L'essentiel de la question

Les pneumonies sont des infections des voies respiratoires basses qui peuvent évoluer sur un mode aigu ou un mode chronique.
Parmi les pneumonies aiguës, on distingue, selon le contexte d'acquisition, les pneumonies communautaires des pneumonies nosocomiales.

Le diagnostic des pneumonies aiguës communautaires est essentiellement clinico-radiologique, associant des signes cliniques d'infection (fièvre, frissons) et fonctionnels (toux, expectorations, dyspnée), et des images radiologiques différenciant de façon schématique les pneumonies lobaires ou alvéolaires des pneumonies interstitielles ou atypiques.
Les principaux agents étiologiques des pneumonies aiguës communautaires dépendent du terrain et sont principalement *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Mycoplasma pneumoniae*.
Le diagnostic bactériologique est peu contributif et un ECBC (Examen cytobactériologique des crachats) sera pratiqué en cas d'échec du traitement probabiliste, ou quand il existe une présomption de micro-organisme inhabituel.
Pour le traitement probabiliste, il est recommandé l'amoxicilline 3 g/j ou un macrolide.

Les pneumonies aiguës nosocomiales surviennent le plus fréquemment dans les services de soins intensifs chez des patients sous ventilation mécanique. Le diagnostic est à la fois clinique, radiologique et bactériologique. Les prélèvements bactériologiques, plus ou moins invasifs (aspiration endotrachéale, brossage bronchique distal protégé, lavage broncho-alvéolaire) doivent permettre de distinguer colonisation et infection et doivent limiter la contamination par la flore oropharyngée. Les résultats sont interprétés en fonction de seuils de dénombrement et toute bactérie présente en quantité significative fera l'objet d'un antibiogramme.
Les bactéries responsables varient en fonction de l'écologie locale. Les bacilles à Gram négatifs (entérobactéries, bacilles non fermentaires) et le *Staphylococcus aureus* sont les plus fréquemment isolés.
Le traitement sera adapté à la sensibilité des bactéries isolées dans les prélèvements bactériologiques.

Pour en savoir plus
- Conférence de consensus : Prise en charge des infections des voies respiratoires basses. *Med Mal Infect* 2006 ; 36 : S231-72
- Collignon A., Cruaud P. Prélèvements bactériologiques : prélèvements bronchiques. 251-54
- Examens cytobactériologiques des sécrétions broncho-pulmonaires. *Le Référentiel en microbiologie médicale* (Rémic), EM2 2004, 47-57.
- Jarraud S. *et al.* Légionellose : diagnostics bactériologique, épidémiologique et prévention. *Feuillets de biologie* 2000 ; vol XXXXI, 237 : 25-8.
- Gueirard P., Njamkepo E., Guiso N. Diagnostics biologiques directs et indirects de la coqueluche. *Med Mal Infect* 2001, 31 : 75S-81S

La tuberculose pulmonaire

P. CRUAUD, Service de microbiologie, hôpital Jean Verdier, AP-HP, Bondy.

I. Histoire naturelle de la maladie
- **A.** Transmission
- **B.** La primo-infection
- **C.** La maladie

II. Rôle du laboratoire
- **A.** Préambule
- **B.** Méthodes de diagnostic conduisant à un résultat rapide
- **C.** Mise en culture
- **D.** Identification de l'espèce
- **E.** Évaluation de la sensibilité aux antibiotiques
- **F.** Analyse épidémiologique

III. Aspects thérapeutiques

IV. Prévention
- **A.** Dépistage des malades
- **B.** Limiter les contacts avec le malade
- **C.** Surveillance des contacts
- **D.** Vaccination

La plupart des affections chroniques du poumon profond, à composante histologique granulomateuse, ne sont pas des alvéolites infectieuses. La principale infection chronique pulmonaire est la tuberculose, même si elle partage avec les précédentes une lymphocytose alvéolaire majeure. Cette affection, causée par le bacille tuberculeux, a constitué un prototype, un modèle dans la manière d'aborder l'histoire naturelle d'une maladie infectieuse, son épidémiologie, sa prophylaxie, sa surveillance et son traitement.
Chaque année, le nombre de nouveaux cas de tuberculose dans le monde est estimé à 8 millions. Les variations de l'expression clinique et des localisations de la tuberculose sont multiples ; la forme pulmonaire est la plus importante à reconnaître car c'est par elle que la transmission de la maladie s'effectue. La méningite tuberculeuse est, quant à elle, la plus redoutable de par les séquelles et la mortalité qu'elle entraîne. On estime que la tuberculose tue encore chaque année environ 3 millions de personnes à travers le monde.
Cette maladie représente un problème majeur de santé publique dans les pays socio-économiquement défavorisés, avec des taux d'incidence qui peuvent dépasser 200/100 000 habitants. L'incidence dans les pays industrialisés a décru régulièrement depuis plusieurs décennies pour atteindre des valeurs comprises entre 10 et 20/100 000 habitants, voire moins pour les pays situés au nord de l'Europe de l'Ouest.
Il s'agit d'une infection non obligatoirement suivie de maladie cliniquement décelable.
Trois espèces du genre Mycobacterium *sont responsables de la tuberculose :* Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis *et* Mycobacterium africanum, *elles appartiennent au dit « complexe tuberculosis ». Mycobacterium tuberculosis (ou bacille de Koch) est le principal responsable de la maladie tuberculeuse. Les personnes infectées en constituent le réservoir naturel. On estime qu'environ le tiers de la population mondiale serait infecté. La transmission de l'infection est assurée principalement par les malades qui souffrent de tuberculose pulmonaire. Ils émettent dans l'air des aérosols contenant les bacilles à l'occasion de tout mouvement expiratoire, et en particulier lorsqu'ils toussent. C'est en inhalant ces bacilles que d'autres individus s'infectent.*
D'autres espèces du genre Mycobacterium *sont également responsables d'infections pulmonaires qui ressemblent en tout point à la tuberculose pulmonaire. Il s'agit de mycobactéries dites atypiques car n'appartenant pas au « complexe tuberculosis »* (Mycobacterium kansasii, Mycobacterium xenopi, *etc.). À la différence de la tuberculose, elles sont opportunistes et profitent d'un déficit immunitaire local (affections pulmonaires chroniques telle la silicose) ou général (Sida) pour engendrer une infection.*
Le genre Mycobacterium présente certaines caractéristiques qui le distinguent des autres genres bactériens couramment rencontrés en pathologie humaine et qui sont mises à profit au laboratoire pour le diagnostic.

I. Histoire naturelle de la maladie

A. Transmission

Elle est assurée par voie aérogène par des aérosols de bacilles émis par les malades atteints de lésions ouvertes sur l'extérieur, essentiellement pulmonaire elle est la forme d'expression la plus fréquente. Il est prouvé que pratiquement seuls les malades présentant des bacilles à l'examen microscopique direct de leurs expectorations sont contagieux pour leur entourage, d'autant que le contact est étroit,

répété, en atmosphère confinée. Ces malades sont dits bacillifères. *A contrario*, les malades dont seule la culture révèle la présence de ces bacilles ne sont pas réellement contagieux. En pratique, environ la moitié des tuberculoses pulmonaires sont bacillifères. On conçoit dès lors l'importance de dépister rapidement de tels patients. On estime qu'un malade ayant un examen direct positif peut contaminer son entourage avec une probabilité évaluée entre 25 et 80 %, alors que ce risque est de l'ordre de 10 à 20 % lorsque l'examen direct est négatif et les cultures positives. L'étroitesse des liens qui lie le cas index des contaminés jouant bien entendu un rôle déterminant. Dans le cas des tuberculoses extra-pulmonaires, seules les lésions ouvertes représentent un risque de contagiosité.

Dans l'air expiré par ces malades qui toussent, crachent, éternuent ou parlent à voix haute, se trouvent de fines gouttelettes supportant les bacilles. Leur rôle a été suspecté dès 1897 par Flügge. Les plus petites d'entre elles tendent à se dessécher. Après réduction considérable de leur volume, elles se stabilisent autour d'une taille moyenne comprise entre 2 et 3 microns et se trouvent rétrécies à l'état de noyau ou *droplet nuclei* de Wells. Chacun peut supporter entre 1 et 10 bacilles, au pouvoir infectant démontré.

Les plus petites de ces particules restent aisément en suspension dans l'air. Leur extraction de l'air ne sera assurée que par une ventilation efficace, tant en qualité qu'en quantité (périodicité et volume du renouvellement). Le port de masques adaptés permet toutefois de se protéger lorsque l'on est amené à pénétrer dans une enceinte avec une atmosphère contaminée par ces particules.

En fait, les objets, vêtements, ne jouent aucun rôle dans la transmission. Celle-ci ne se conçoit donc que d'un individu à un autre. Très exceptionnellement, des transmissions d'un animal infecté à l'homme sont rapportées. Il n'existe aucun réservoir environnemental, cependant des infections cutanées sont décrites faisant suite à une contamination d'une érosion ou lésion cutanée à partir du sol contaminé par des crachats de patients tuberculeux. Ainsi, dans les zones tropicales, des tuberculoses cutanées au niveau des membres inférieurs auraient pour source le sol contaminé par des crachats de patients tuberculeux.

La tuberculose, maladie humaine essentiellement liée à l'urbanisation, caractérise les périodes d'intense industrialisation et de concentration humaine. Au laboratoire, le risque contagieux tient à la constitution accidentelle d'aérosols lors du traitement des produits pathologiques ou des cultures. On y remédie par des mesures adaptées en s'isolant de l'agent infectieux (hotte, centrifugeur caréné) et en protégeant le manipulateur (masque, lunettes). Pour mémoire, la forme digestive est essentiellement contractée après ingestion de produits laitiers contaminés par le bacille tuberculeux bovin.

B. La primo-infection

Les personnes nouvellement infectées vont, pour la plupart, demeurer asymptomatiques. Au niveau alvéolaire, les bacilles sont phagocytés par les macrophages. Toutefois, chez les individus indemnes de tout contact antérieur, ils ne sont pas détruits et peuvent même se multiplier au sein du macrophage. Cette résistance à l'action bactéricide du macrophage est due à une inhibition de la fusion du phagosome et des lysosomes. Ces microcolonies intracellulaires conduisent à la lyse du macrophage

qui libère des bacilles de nouveau phagocytés par d'autres cellules. Un petit foyer inflammatoire contenant quelques centaines de bacilles se constitue localement. Certaines de ces bactéries sont, par l'intermédiaire des cellules phagocytaires, drainées vers les ganglions lymphatiques proches du territoire infecté. À ce niveau, une réponse immunitaire spécifique va se mettre en place. Elle est principalement sous la dépendance de lymphocytes T. Un granulome se constitue avec présence de cellules géantes et de lymphocytes entourant les macrophages infectés mais stimulés.
Cette réponse immunitaire conduit le plus souvent à un arrêt de la multiplication des bacilles et à l'apparition d'une hypersensibilité retardée aux protéines de *Mycobacterium tuberculosis* contenu dans la tuberculine et quantifiable par une intradermo-réaction (IDR ou test de Mantoux).
Il faut environ 6 semaines après le contage pour la voir apparaître. Elle correspond à l'établissement d'une immunité spécifique à médiation cellulaire. Cet état n'est toutefois pas spécifique d'une infection à *Mycobacterium tuberculosis* car un grand nombre d'antigènes de la tuberculine sont propres au genre *Mycobacterium*.
Récemment, d'autres méthodes plus spécifiques ont été décrites. Elles reposent sur la recherche de production d'interféron gamma à partir des lymphocytes du sang après stimulation par certains peptides contenus dans la tuberculine, mais ayant une spécificité d'espèce et non de genre. L'une de ces techniques est commercialisée (QuantiFERON *TB Gold in Tube*, Cellestis, Allemagne) et des recommandations d'usage doivent être formulées par la Haute Autorité de Santé.
C'est à ce moment que se forme le granulome qui sera suivi ultérieurement de la caséification des lésions primaires. Durant cette période d'approximativement un mois et demi, le risque de dissémination hématogène du bacille de Koch est maximal. La vaccination BCG aurait pour effet de diminuer ce risque en permettant l'instauration d'une réponse immunitaire plus précoce en cas d'infection. La formation du caséum solide correspond à une cicatrisation. Celle-ci peut ne pas s'établir et le patient évolue vers la maladie tuberculeuse.
Le risque d'évolution vers la tuberculose maladie, survenant d'emblée après la primo-infection, est estimé entre 3 et 5 % dans les 2 premières années qui suivent l'infection. Cette probabilité est d'autant plus grande que l'immunité à médiation cellulaire du patient est défaillante (grande dénutrition, cancers, Sida où le risque est évalué à au moins 50 % voire bien plus, personnes âgées ou nourrissons, femmes enceintes…).
Pour les individus infectés n'ayant pas évolué d'emblée vers la maladie tuberculeuse, il s'établit un équilibre entre *Mycobacterium tuberculosis* et l'immunité protectrice et spécifique de l'individu. Pour certains, les lésions primaires pourront se stériliser avec un délai variable, laissant place à des zones séquellaires calcifiées. Pour d'autres, des bacilles vivants restent présents au sein d'un caséum solide. Pour peu qu'une baisse plus ou moins importante de cette immunité protectrice survienne, l'équilibre est rompu et les lésions se « réactivent », le caséum se ramollit ; le processus d'évolution vers la tuberculose maladie est enclenché. Il n'existe aucun moyen pour reconnaître les patients qui s'orientent vers cette évolution. Le taux moyen de ces réactivations peut être évalué entre 1 et 10/an pour 10 000 personnes infectées.
Ici encore, toutes les causes altérant l'immunité des patients vont favoriser la probabilité de réactivation. La répétition des contages et l'importance de la charge de contamination sont également des facteurs qui favoriseront le risque de survenue de la tuberculose maladie.

C. La maladie

Au niveau pulmonaire, la lésion de primo-infection va évoluer progressivement et relativement lentement pour aboutir en quelques mois à la constitution d'une nécrose unique ou multiple, contenant un très grand nombre de bacilles (10^7 à 10^9). Lorsque cette lésion s'ouvre vers une bronche, les bacilles sont évacués avec les crachats souvent accompagnés d'une hémoptysie lorsqu'un territoire vasculaire est concerné. Entre 50 et 60 % des malades sont bacillifères et vont donc représenter un réservoir important de contamination de leur entourage.
Les signes cliniques à ne pas méconnaître, bien qu'inconstants, sont : fièvre, toux, asthénie, anorexie, amaigrissement et sudation nocturne (certains sont partagés avec d'autres pathologies, en particulier les néoplasies).
La non-reconnaissance de la maladie, en particulier à un stade précoce, peut conduire à des attitudes thérapeutiques inadaptées qui, pour certaines, pourront amender certains signes cliniques et rallonger le délai de prise en charge adaptée de la tuberculose. Pour d'autres, elles pourront aggraver la maladie.
D'un point de vue anatomo-pathologique, la tuberculose maladie se distingue par l'importance de la nécrose, la destruction et la liquéfaction des tissus infectés qui, en s'évacuant, laissent place à des cavités. La destruction est suivie de fibrose cicatricielle avec insuffisance respiratoire irréversible. La radiographie pulmonaire permet de mettre en évidence ces lésions et de suivre leur évolution.
L'évolution spontanée en dehors de tout traitement comporte trois possibilités, dans les 2 ans qui suivent le début de la maladie :
- 50 % des patients meurent ;
- 25 % guérissent (avec séquelle fonctionnelle) ;
- 25 % deviennent chroniques et vont constituer un réservoir pérenne.

En moyenne, on estime que chaque source d'infection serait à l'origine de 10 à 20 nouveaux cas de tuberculose si aucune mesure préventive n'était prise. La recherche et l'identification du bacille tuberculeux, dans un produit pathologique, procèdent donc d'un double souci :
- individuel, en guérissant le malade ;
- collectif, en prévenant la dissémination.

II. Rôle du laboratoire

A. Préambule

1. Quelques caractéristiques importantes à connaître

Plus de 80 espèces différentes composent le genre *Mycobacterium* possédant les caractéristiques suivantes :
- Il s'agit de bacilles droits ou légèrement incurvés capables de retenir les colorants même après traitement par les acides et les alcools, d'où leur dénomination de **bacilles acido-alcoolo-résistants** (BAAR). Cette propriété va être mise à profit pour les rechercher par examen microscopique des échantillons biologiques. D'autres

bactéries possèdent une relative acido-alcoolo-résistance (AAR) : *Nocardia*, *Gordona*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Tsukamurella*, et à un moindre degré *Corynebacterium* ;
- Les mycobactéries possèdent une paroi très riche en lipide avec en particulier la présence d'acides mycoliques (acides gras à longue chaîne carbonée, alpha ramifiés et bêta hydroxylés) associés à de nombreuses autres molécules lipidiques. Ces lipides constituent une importante barrière hydrophobe responsable en partie de l'AAR et de la **relative résistance à différents agents chimiques, dont les antibiotiques**.

À l'exception de *Mycobacterium leprae* (agent de la lèpre), les mycobactéries sont **cultivables *in vitro***. Les espèces responsables de la tuberculose **croissent lentement**, conduisant à des délais de réponse prolongés. Pour comparer, le temps de génération de *Mycobacterium tuberculosis* est de l'ordre de 17 heures alors qu'il n'est que d'une vingtaine de minutes pour *Escherichia coli*. La présence d'une flore saprophyte, souvent associée dans les échantillons biologiques issus de sites ouverts croissant rapidement sur les milieux de culture, doit impérativement être détectée puis la flore sera éliminée avant de procéder à des cultures.

C'est la raison pour laquelle une **décontamination des échantillons biologiques** sera effectuée systématiquement en mettant à profit la résistance des mycobactéries à l'action de différents agents chimiques.

L'évolution de la maladie tuberculeuse montre que « l'excrétion » des bacilles à partir des lésions est variable au cours du temps et dépend de « l'ouverture » des granulomes ou des zones de caséification en cours de ramollissement.

Au cours de la tuberculose pulmonaire, il est clairement démontré que la **répétition des examens améliore le rendement des résultats**. Pour ce qui est des malades qui peuvent cracher, la succession de recueils sur plusieurs jours, le matin à jeun après rinçage de la cavité buccale par de l'eau en s'aidant éventuellement d'une kinésithérapie, sera recommandée.

L'expérience montre que la sensibilité du diagnostic augmente considérablement lorsque le nombre des recueils passe de 1 à 3, puis ne s'accroît guère au-delà. C'est pour cette raison que la prescription médicale demande un examen sur au moins 3 échantillons. Pour les malades ne pouvant pas cracher, l'utilisation d'un tubage gastrique le matin à jeun peut être préconisé. Il a pour but de recueillir dans l'estomac les sécrétions bronchiques dégluties par le patient. Ici encore, la répétition des examens est recommandée.

Enfin, il est parfois fait appel à des méthodes de recueil plus invasives par fibroscopie bronchique, en particulier en cas de difficultés diagnostiques. Bien entendu, la répétition de cet examen est peu envisageable. Toutefois, il pourra favoriser ultérieurement l'excrétion escomptée des bacilles et il sera légitime de prescrire une nouvelle série d'examens de crachats ou de tubages gastriques.

2. La conduite du diagnostic au laboratoire

Les échantillons, après leur recueil, devront être rapidement acheminés au laboratoire dans un récipient hermétiquement clos. Ceux-ci pourront alors être conservés plusieurs heures au frais jusqu'à leur traitement. Si le transport nécessite des délais importants, il est recommandé d'additionner un antiseptique tel que le chlorure de cétylpyridinium, qui évitera la pullulation bactérienne.

Le traitement des échantillons d'origine bronchique suivra toujours le même processus en vue d'un double objectif :

- d'une part, de pratiquer un examen permettant de fournir une réponse rapide. L'examen microscopique à la recherche de BAAR est le plus courant, d'autres méthodes peuvent également être mises en œuvre ;
- d'autre part, de procéder à une mise en culture, avec des délais de réponse prolongés, qui aura pour mérite de sensibiliser le diagnostic mais aussi d'isoler la bactérie. Il sera alors possible de l'identifier, de mesurer sa sensibilité aux antibiotiques et éventuellement de procéder à des études d'ordre épidémiologique.

Il existe une grande diversité de méthodes, qui seront succinctement détaillées plus loin et qui présentent chacune des avantages et des inconvénients.

La manipulation des bactéries, en particulier celles appartenant au « complexe *tuberculosis* », n'est pas dénuée de risque pour le personnel du laboratoire. Elle doit être faite dans un laboratoire convenablement équipé répondant à des critères de sécurité adéquats.

Le traitement de l'échantillon débutera par sa fluidification. La plupart des méthodes de décontamination, qui seront décrites dans le chapitre « Mise en culture », couvrent cet objectif. Afin de concentrer les mycobactéries, une centrifugation adaptée (2 000 G pendant 20 minutes) sera effectuée. Le culot de centrifugation servira aux différents traitements ultérieurs.

Le diagnostic indirect de la maladie est proposé par certains auteurs. La production d'anticorps au cours de la maladie a pu être démontrée. Leur rôle est très limité dans la physiopathologie de la maladie. Cette production d'anticorps apparaît fluctuante au cours du temps et varie d'un individu à l'autre. D'autre part, la plupart des antigènes qui ont été proposés pour cet objectif manquent de spécificité et de nombreuses réactions croisées sont décrites. Il semble donc que le diagnostic de la tuberculose ne puisse pas être facilement abordé par ce biais.

B. Méthodes de diagnostic conduisant à un résultat rapide

1. Examen microscopique

C'est la méthode la plus simple, la plus rapide et la moins onéreuse qui peut-être pratiquée sur le terrain avec peu de moyen, directement sur l'échantillon original. Elle souffre cependant d'un manque de sensibilité mais a le mérite de dépister les patients qui représentent le plus fort risque de contagion. Sa spécificité est excellente pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire. Toutefois, cette méthode ne permet pas de distinguer les bactéries responsables de la tuberculose des autres mycobactéries atypiques. Selon le contexte clinique, en particulier au cours du Sida, il ne sera pas possible de trancher entre une mycobactériose et une authentique tuberculose.

Son principe repose sur la mise en évidence, au sein d'un échantillon de qualité, de BAAR. Les préparations microscopiques après fixation sont colorées puis subissent l'action combinée de l'acide et de l'alcool. Après rinçage, le frottis est soumis à une coloration de fond.

L'examen microscopique peut se faire soit par microscopie à transmission directe, utilisant comme colorant la fuchsine (méthode de Ziehl-Neelsen, à chaud, méthode

de Kinyoun, à froid) ; soit par microscopie en fluorescence utilisant un colorant fluorescent (l'auramine). L'avantage de la seconde méthode est la plus grande rapidité de lecture des frottis. En effet, la surface observée instantanément en microscopie à fluorescence est beaucoup plus importante qu'en microscopie à transmission directe.
Quelques causes d'erreur sont à connaître qui peuvent conduire à des résultats faussement positifs ou négatifs :

- résultats faussement positifs : particules donnant un aspect de BAAR tels que des débris alimentaires (fibres végétales ou grains de pollens) ou des précipités de colorants, la présence de bactéries d'autres espèces voire du genre *Mycobacterium*, éraflures de la lame de préparation microscopique. Il peut s'agir aussi, lorsque différents échantillons sont colorés simultanément, de la présence de bacilles tuberculeux qui se sont malencontreusement décollés d'un frottis positif pour venir se fixer sur un frottis normalement négatif. À noter qu'il n'est pas rare également d'observer la présence de BAAR après qu'un traitement efficace a été instauré. Dans ce cas, bien souvent, les cultures resteront négatives ;
- résultats faussement négatifs : le recueil, la conservation, la préparation ou la coloration en vue de l'examen microscopique de l'échantillon peuvent être de mauvaise qualité.

2. Méthodes génomiques

Il s'agit de méthodes théoriquement très sensibles mais onéreuses, et nécessitant une infrastructure adaptée.
La recherche par hybridation *in situ* avec des sondes spécifiques a fait l'objet d'essais. Cette méthode reste décevante et n'est pas meilleure que l'examen microscopique.
Le diagnostic de la tuberculose par amplification génomique est beaucoup plus séduisant. La méthode est maintenant bien codifiée et des kits prêts à l'emploi sont commercialisés. Ces méthodes permettent d'identifier rapidement au sein du prélèvement les mycobactéries appartenant au « complexe *tuberculosis* ». Bien que théoriquement plus sensible que l'examen microscopique, la sensibilité de cette méthode, en particulier pour les échantillons paucibacillaires tels que ceux donnant un examen microscopique négatif avec une culture positive, est décevante. Quelques rares réactions faussement positives sont parfois décrites mais cette méthode possède néanmoins une excellente spécificité.
Actuellement, l'utilisation systématique de cette méthode pour tous les échantillons d'origine pulmonaire mérite d'être discutée. Ces méthodes seraient plus à recommander pour être utilisées avec les échantillons présentant un examen direct positif afin de préciser l'identification de la mycobactérie observée. La mise en culture présente une bien meilleure sensibilité.

3. Mise en évidence de molécules spécifiques

Il s'agit de méthodes très peu utilisées car réservées à des centres équipés de matériels adaptés à ces recherches. Elles s'adressent plus volontiers à des échantillons nobles tels que les liquides céphalo-rachidiens. Différentes molécules ont été proposées. L'acide tuberculostéarique recherché par chromatographie en phase gazeuse fait partie des candidats.

C. Mise en culture

1. Méthodes de décontamination

Le but de la décontamination est d'éliminer la flore saprophyte des échantillons, afin qu'elle ne vienne pas contaminer les milieux de culture et interdire la mise en évidence des mycobactéries. Le choix des substances décontaminantes, leurs concentrations et les temps et température de contact, doivent être optimaux pour préserver la vitalité des mycobactéries, tout en inhibant au maximum la croissance de toutes les autres espèces. Les méthodes couramment utilisées sont adaptées aux mycobactéries du « complexe *tuberculosis* » et peuvent, pour ce qui est des autres espèces, nécessiter une adaptation. Afin de s'assurer de la qualité des méthodes de décontamination utilisées, le taux de contamination des cultures doit être régulièrement apprécié. Un trop grand nombre de contamination indique une méthode insuffisamment agressive et, *a contrario*, un trop faible taux de contamination est signe d'une décontamination *a priori* trop caustique, risquant de dépasser son objectif et de détruire aussi les mycobactéries. On admet qu'un taux de contamination de l'ordre de 2 à 3 % est normal.

Il est possible de compléter l'action de cette décontamination en incorporant des antibiotiques ou autres molécules inhibitrices dans les milieux de cultures. Le mélange PANTA (polymyxine, amphotéricine, acide nalidixique, triméthoprime et azlocilline), parfois renforcé par la vancomycine, est recommandé lorsque les cultures sont pratiquées en milieu liquide.

Les produits utilisés peuvent être des bases (soude – méthode de Petroff –, phosphate trisodique), des acides (acides sulfurique, chlorhydrique, oxalique) ou des antiseptiques associés ou non aux précédents (lauryl-sulfate de sodium, chlorure de cétylpyridinium). L'action des bases et des acides sera arrêtée, après le temps nécessaire, par neutralisation le plus souvent en présence d'un indicateur de pH. Après centrifugation le culot sera ensemencé. Il est possible d'associer des mucolytiques, en particulier avec des décontaminants alcalins.

Alors que l'association soude et N-acétyl-cystéine est utilisable avec tous les milieux de culture, il n'en va pas de même de l'association soude et lauryl-sulfate qui ne pourra permettre des ensemencements que sur milieu à base d'œuf coagulé.

2. Méthodes de culture et détection

a) Milieux solides

Les milieux à base d'œufs coagulés, auxquels est souvent adjoint du vert malachite, sont très largement utilisés. L'un d'entre eux, le milieu de Löwenstein-Jensen, est recommandé par l'Union internationale contre la tuberculose et les maladies respiratoires. L'adjonction d'un complément tel l'acide pyruvique favorisera la croissance de certaines mycobactéries dont *Mycobacterium bovis*. Le milieu de Coletsos répond à cette exigence. Des milieux gélosés sont également utilisables tels les milieux de Middlebrook 7H10 et 7H11. Ils présentent l'avantage de pouvoir être préparés facilement et il est possible d'incorporer des suppléments et/ou des antibiotiques, notamment pour évaluer la sensibilité des mycobactéries aux antibiotiques. Les milieux de cultures sont incubés à 35 ou 37 °C pour ce qui est des bactéries du « complexe *tuberculosis* », dans des conditions telles que les milieux ne se dessèchent pas.

Pour d'autres espèces, des températures différentes peuvent être recommandées. Une culture positive se traduira par l'apparition de colonies en une vingtaine de jours lorsqu'il s'agit de *Mycobacterium tuberculosis*. Ces colonies sont rugueuses en aspect de fleur de chou-fleur avec une couleur légèrement chamois.

b) Milieux liquides

Les milieux liquides 7H9 et 7H12 de Middlebrook complétés de différents suppléments, le milieu de Dubos et le milieu de Kirchner, sont restés longtemps peu utilisés. L'usage d'automates couplant une incubation à un système de détection automatique de croissance a redonné un intérêt à ces milieux, d'autant que les délais de positivité sont souvent plus brefs que pour les milieux solides (une dizaine de jours pour *Mycobacterium tuberculosis*). Par ailleurs, certaines études ont montré que la sensibilité de la recherche des mycobactéries était supérieure lorsque les cultures étaient pratiquées sur ces milieux.

Le coût de ces cultures est toutefois bien supérieur à celles utilisant une détection visuelle, en particulier sur milieu solide. S'il existe un gain de temps pour la détection des cultures, la durée de technique manuelle reste le même. L'inconvénient pratique majeur est le risque de contamination de ces milieux liquides, et l'adjonction d'un cocktail d'antibiotiques est systématique, augmentant le nombre des manipulations de préparation. Enfin, leur utilisation ne peut pas dispenser de la mise en culture sur milieu gélosé, dans certains cas seuls les milieux gélosés permettent d'obtenir une culture.

Différentes possibilités sont offertes :

- Méthode Bactec 460 (Becton Dickinson) : l'incubation se fait en présence d'acide palmitique marqué au ^{14}C. Le métabolisme mycobactérien conduit à la formation de $^{14}CO_2$. Des mesures séquentielles de l'atmosphère des flacons de culture indiquent la présence d'une croissance mesurée par un G.I. (Growth Index). Cette méthode est très performante mais présente l'inconvénient d'utiliser des radioéléments. C'est pour cette raison que les systèmes suivants ont été développés ;
- Dispositif MB Check (Becton Dickinson) : il s'agit d'un système biphasique, liquide et solide séparés. Par retournement du flacon, le milieu solide est régulièrement ensemencé à partir du milieu liquide. La culture est appréciée visuellement ;
- Méthode MGIT (Becton Dickinson) pour Mycobacteria *Growth Indicator Tube* : Des tubes de bouillons 7H9 contiennent un indicateur (sel de ruthénium) qui émet une fluorescence proportionnellement à l'abaissement de la pression partielle en oxygène qui se produit au décours de la croissance des mycobactéries. La lecture peut être visuelle à l'aide d'une lampe à ultraviolet, ou automatique grâce à l'aide d'un automate ;
- Méthode MB/Bact T (Becton Dickinson) : méthode proche de la précédente qui utilise un indicateur sous forme d'une pastille collée au fond du flacon de culture. L'indicateur est sensible à la variation de pH qui se produit en cas de culture. La lecture est automatisée ;
- Méthode MB Redox : dernière méthode commercialisée, elle fait usage du milieu de Kirchner et contient un indicateur incolore (sel de tétrazolium) qui se transforme en formazan (précipitation de grains rouges) lorsque la pression partielle en oxygène diminue.

L'usage d'un milieu liquide semble être un bon choix, au détriment d'un coût supérieur, compte tenu des délais de détection plus courts et d'une meilleure sensibilité de détection des cas de tuberculoses, en particulier paucibacillaires. Cependant, l'usage d'un milieu solide doit être conservé.

D. Identification de l'espèce

L'identification de l'espèce mycobactérienne sera pratiquée à l'issu de cette culture. Pour toute culture positive, un examen microscopique authentifiant le caractère acido-alcoolo-résistant des bactéries isolées sera effectué. L'aspect des bacilles à l'examen microscopique, celui des colonies, la vitesse de croissance, pourront donner des éléments présomptifs quant à l'identité de l'espèce. L'identification est une tâche délicate et le recours à un laboratoire de référence est souvent utile. Cependant, les mycobactéries du « complexe *tuberculosis* » répondent à un certain nombre de caractéristiques spécifiques qui aident à leur identification.

1. Méthodes phénotypiques

Les mycobactéries du « complexe *tuberculosis* » ont une croissance lente, sont non pigmentées. Leur croissance est inhibée par l'acide para-nitrobenzoïque et l'hydroxylamine. Elles possèdent une catalase thermolabile, à l'exception de certaines souches devenues résistantes à l'isoniazide. Selon l'espèce, la présence d'une uréase, d'une nitrate réductase et la production de niacine (nicotinamide) sont retrouvées.

2. Méthodes génomiques

L'identification peut se faire à l'aide de sondes par hybridation moléculaire. La région reconnue par ces sondes intéresse l'ARN ribosomal 16S. Elle se pratique directement à partir de colonies isolées sur milieu solide, ou à partir du bouillon lorsque les cultures sont effectuées en milieu liquide. Des kits sont commercialisés (Accuprobe, Gen-Probe bioMérieux) de mise en œuvre aisée. Le coût de cette méthode est supérieur aux méthodes phénotypiques. La différenciation des espèces au sein du complexe *tuberculosis* n'est toutefois pas possible.

Plus récemment, des techniques d'amplification génotypique suivie d'hybridation autorisent une bien meilleure approche de l'identification, tant sur le plan des mycobactéries atypiques que sur celles du complexe *tuberculosis*. Deux kits sont commercialisés : INNO-LiPA (Innogenetic, Belgique) et GenoType (Hain, Lifescience, Allemagne).

E. Évaluation de la sensibilité aux antibiotiques

Les mycobactéries se caractérisent par leur résistance naturelle à de nombreux antibiotiques. Leur paroi représente une importante barrière d'imperméabilité qui est l'une des raisons principales de cette résistance. Par ailleurs, les mycobactéries sont des bactéries à croissance principalement intracellulaire, ce qui restreint encore l'éventail des antibiotiques utilisables en thérapeutique.

Toutefois l'isoniazide (hydrazide de l'acide nicotinique), la rifampicine, l'éthambutol, le pyrazinamide, les aminosides et en particulier streptomycine et amikacine et les fluoroquinolones développés après 1980, sont des antibiotiques qui présentent une excellente activité vis-à-vis de *Mycobacterium tuberculosis*. D'autres molécules sont également actives mais présentent souvent une importante toxicité.
Dès l'origine de l'utilisation des antibiotiques antituberculeux et très rapidement, des résistances acquises ont été décrites. Dans tous les cas, cette résistance acquise procédait de la sélection de mutants résistants. Ces mutations sont des phénomènes naturels qui se produisent avec une fréquence suffisante pour que, dans une population équivalente à celle rencontrée au sein d'une caverne tuberculeuse, une sous-population résistante existe et soit sélectionnée au cours du traitement. La polychimiothérapie, qui est de règle pour le traitement de la tuberculose, a pour but d'éviter cette sélection.
La mesure de la sensibilité aux antibiotiques tuberculeux est l'un des rôles du laboratoire de bactériologie. En règle, elle est pratiquée après l'isolement par culture de la mycobactérie. Toutefois, en cas d'examen direct positif, cette détermination peut être pratiquée directement à partir de l'échantillon biologique convenablement décontaminé afin de gagner du temps pour l'obtention du résultat.

1. Méthode par culture

L'évaluation de la résistance aux antituberculeux peut se pratiquer sur milieu solide ou en milieu liquide avec l'avantage d'obtenir des résultats plus rapidement.
La méthode utilisée est particulière compte tenu, d'une part, de la croissance lente des espèces incriminées et, d'autre part, du mode d'expression de la résistance par mutation. La résistance sera définie par une fréquence trop élevée de mutants résistants (proportion critique) au sein de la population mycobactérienne étudiée.
La méthode dite des proportions, mise au point par Canetti G., Rist N. et Grosset J., consiste à ensemencer un inoculum défini de la souche à étudier sur des milieux de culture solide contenant pour chacun une concentration définie d'antibiotique.
Après une incubation de l'ordre de 3 semaines à 37 °C, la proportion des bactéries résistantes est évaluée en confrontant le nombre des colonies dénombrées sur les milieux contenant les antibiotiques à des milieux témoins exempts d'antibiotiques, ensemencés dans les mêmes conditions. La concentration d'antibiotique utilisée dépend du milieu de culture.
La proportion critique est en règle de 1 %, mais de 10 % pour le milieu de Löwenstein-Jensen en ce qui concerne certains antibiotiques (éthambutol, kanamycine, viomycine, D-cyclosérine et pyrazinamide). Au-delà de ces proportions, la souche est déclarée comme résistante à l'antibiotique.
L'évaluation de l'activité du pyrazinamide se fait en milieu acide, nécessitant d'utiliser des tubes témoins au même pH. Une autre particularité à ne pas méconnaître concerne l'évaluation de la sensibilité à la rifampicine sur milieu de Löwenstein-Jensen. Le fournisseur utilise la rifamycine, permettant une meilleure conservation des milieux de culture. Bien que cet artifice ne modifie pas la qualité de la détermination de la résistance à la rifampicine en ce qui concerne des mycobactéries du « complexe *tuberculosis* », il en est autrement de certaines mycobactéries atypiques comme *Mycobacterium kansasii*, naturellement résistante à la rifamycine mais naturellement sensible à la rifampicine.

En milieu liquide, le principe est proche, il consiste à comparer la croissance dans des milieux contenant des antibiotiques et dans les milieux témoins. Les milieux Bactec 460 et MGIT se prêtent à cette mesure. Les délais de réponse sont d'une dizaine de jours.
Une autre méthode, plus marginale, a pu être utilisée pour mesurer la croissance en présence d'antibiotiques. À l'aide d'un bactériophage, un gène codant et exprimant une luciférase est introduit dans les mycobactéries qui, lorsqu'elles vont croître en présence d'ATP et de luciférine (substrat de l'enzyme), vont donner au milieu de culture une fluorescence.

2. Méthodes génomiques

La description de mutations connues sur des gènes impliqués dans la résistance acquise à un antibiotique chez les mycobactéries permet de proposer différentes techniques pour leur détection. Les réponses peuvent être obtenues en quelques heures. Les techniques utilisées à ce jour reposent sur une amplification par PCR (*Polymerase chain reaction*) du gène, ou partie du gène, susceptible d'avoir muté. Le produit d'amplification est analysé selon différents procédés afin de mettre en évidence la mutation qui pourrait être à l'origine de la résistance (séquençage, profil électrophorétique, hybridation à des sondes – dans l'avenir avec des puces à ADN). Pour la rifampicine, un seul gène *rpoB* a été incriminé dans la résistance à cet antibiotique et la recherche par cette méthode permet de détecter plus de 90 % des souches résistantes. Les déterminants de la résistance à l'isoniazide sont beaucoup plus complexes et concernent plusieurs gènes. Toutefois, à ce jour, 70 % des souches présentant une résistance à l'isoniazide peuvent être détectées.
Avec cette méthode, il est ainsi possible d'identifier rapidement une résistance à deux antibiotiques majeurs du traitement de première ligne de la tuberculose. Pour les autres antituberculeux, il n'y a pas de kit commercialisé, cependant les gènes qui ont fait l'objet d'une mutation et qui sont à l'origine d'une résistance sont identifiés pour ce qui est du pyrazinamide, de l'éthambutol, des aminosides, des quinolones et des thionamides.

F. Analyse épidémiologique

Il est parfois utile de démontrer la parenté qui peut exister entre différents isolats, en particulier isolés de différents patients, pour prouver l'éventualité d'une transmission croisée. Les méthodes utilisées sont pour la plupart réservées à des laboratoires spécialisés.
Avant le développement des techniques de biologie moléculaire, la lysotypie était très utilisée pour le typage de *Mycobacterium tuberculosis*. Il s'agit d'une méthode délicate à mettre en œuvre et peu discriminante.
Les méthodes de digestion de l'ADN par des enzymes de restriction suivie d'une électrophorèse des fragments le plus souvent en champ pulsé (RFLP pour *Restriction Fragment Length Polymorphism*) sont bien plus performantes mais de mise en œuvre délicate. Elles peuvent être suivies d'une détection des fragments par des sondes spécifiques reconnaissant des fragments répétés au sein du génome des mycobactéries du « complexe *tuberculosis* », rendant la méthode plus aisée et très

performante. Une séquence d'insertion nommée *IS6110* est à ce titre largement utilisée. Cependant, certaines souches souffrent d'un faible nombre de copies de l'*IS6110*. D'autres éléments peuvent également être utilisés : *IS1081*, MPTR, PGRS…

Plus récemment, une autre méthode dénommée *spoligotyping* a été décrite et un kit commercialisé (Isogen Bioscience BV, Pays-Bas). Elle consiste à amplifier une région particulière du génome mycobactérien contenant un grand nombre de séquences répétées (DR) qui servent d'amorce à l'amplification, et d'évaluer le polymorphisme des séquences situées entre ces régions. Ce polymorphisme est apprécié par la diversité des produits d'amplification qui s'hybrident sur une membrane sur laquelle est fixée en différents lieux les différentes séquences inter-DR d'une souche de référence.

Cette méthode autorise également à différencier entre elles les différentes espèces du « complexe *tuberculosis* », mais reste moins performante que le RFLP *IS6110*. Elle sera plus utilisée dans un objectif de criblage.

Enfin, une technique récente dénommée MIRU-VNTR (pour *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeat*) explore 12 régions (parmi 41 décrites chez le groupe *tuberculosis*) en termes de variation dans le nombre de répétitions en tandem. Les polymorphismes retrouvés permettent d'évaluer les possibles clonalités entre souches pouvant être reliées sur le plan épidémiologique.

III. Aspects thérapeutiques

Le traitement de la tuberculose suit un schéma particulier qui tient compte de la croissance intracellulaire et lente de la bactérie, des différents stades d'évolution des lésions et de la résistance rapidement acquise aux antibiotiques par mutation. Le statut immunitaire du patient aura également un rôle prépondérant dans la réussite du traitement. Le recours à la chirurgie est rarement nécessaire.

Le traitement de la tuberculose pulmonaire est codifié et rapidement efficace. S'il est convenablement mené, il conduit à la guérison dans plus de 90 % des cas. Il repose sur une polychimiothérapie afin d'éviter la sélection de bactéries résistantes. L'usage de 3 voire 4 antibiotiques est la règle. Il s'agit de l'isoniazide, de la rifampicine, de l'éthambutol et du pyrazinamide.

Ce traitement sera poursuivi pendant 6 mois selon la chronologie suivante : au cours des 2 premiers mois, les 3 ou 4 antibiotiques sont associés en une prise quotidienne puis, au cours des 4 mois suivants, seuls l'isoniazide et la rifampicine seront poursuivis. La contagiosité du patient décroît très rapidement après le début du traitement, suivie des signes cliniques qui s'amendent progressivement. Dans le cas d'une immunodépression chronique, le traitement est parfois poursuivi plus longtemps.

En France, avec un tel régime, le risque de sélectionner un mutant résistant est nul si le patient n'a jamais été traité auparavant. En effet, la probabilité de résistance primaire, c'est-à-dire la probabilité qu'une souche présentant une résistance soit isolée d'un patient jamais traité, est rare. Il n'en va pas de même de tous les pays.

La mauvaise conduite d'un traitement conduit à deux conséquences qu'il faut connaître :

- Si les associations sont convenablement respectées mais la durée de traitement trop courte, une rechute est à redouter. Le traitement devra être reconduit selon le régime codifié ;
- Plus grave est le mauvais respect de l'association des antibiotiques conduisant à une rechute qui peut alors se produire avec une souche devenue résistante à l'un ou plusieurs des antibiotiques. Il s'agit alors d'une résistance secondaire. La seconde cure de traitement sera plus délicate et pourra nécessiter l'usage d'autres molécules actives contre le bacille tuberculeux.

Afin de minimiser les contraintes d'un traitement long et associant plusieurs médicaments qui conduit parfois les patients à ne pas le respecter, une dispense contrôlée des médicaments peut être proposée. Certaines formulations galéniques des antituberculeux associant différentes molécules entre elles (Rifater® et Rifinah®) sont également à recommander.

Pour mémoire, la résistance des souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées en France est la suivante :

- isoniazide : résistance primaire 5 % et résistance secondaire 17 % ;
- rifampicine : résistance primaire 0,7 % et résistance secondaire 9 % ;
- multirésistance : association d'une résistance couplée à l'isoniazide et à la rifampicine : 0,6 % en 1999.

Enfin, il faut rappeler que les principaux antibiotiques antituberculeux ne sont pas dénués de toxicité, en particulier hépatique pour l'isoniazide et la rifampicine. Des interactions médicamenteuses ne sont pas rares. Dans ces cas, le traitement de la maladie devient délicat et nécessite d'être discuté après avis spécialisés.

IV. Prévention

A. Dépistage des malades

Les malades souffrant de tuberculose pulmonaire et tout particulièrement les patients présentant des examens directs positifs de leurs crachats représentent une importante source de contamination pour leur entourage. Leur dépistage, le plus précocement possible, concourt à prévenir la dissémination du bacille aux sujets-contacts. Toutefois, cette tâche est difficile et les délais entre l'apparition des premiers symptômes et le diagnostic sont souvent prolongés : plusieurs semaines voire plusieurs mois.

Des campagnes de dépistage par des examens radiologiques ont été proposées. Elles n'ont pas montré leur efficacité.

Tout au plus, le dépistage des patients infectés à l'aide d'une intradermo-réaction à la tuberculine est envisageable. Ce test est de mise en œuvre difficile et souffre d'un manque de sensibilité et de spécificité. Il n'a pas pour objectif le diagnostic de la maladie. D'autre part, il n'indique aucunement la probabilité d'évolution vers la maladie lorsque la réaction est positive. Cependant, sur le plan collectif, il donne une indication épidémiologique quant à la proportion des personnes infectées au sein d'une population.

B. Limiter les contacts avec le malade

L'hospitalisation d'un patient tuberculeux nécessite des précautions. Un isolement de type respiratoire doit être impératif tant qu'un traitement qui a montré son efficacité n'a pas été mis en place. Le risque de contamination d'autres patients, en particulier ceux souffrant de déficits immunitaires, est à redouter. Le contage se produit directement à partir du malade et plus rarement indirectement par du matériel mal décontaminé (fibroscope…). Le risque de contage direct existe aussi pour l'ensemble du personnel médical et paramédical.
La tuberculose est une maladie à déclaration obligatoire qui peut être reconnue comme maladie professionnelle.

C. Surveillance des contacts

L'ensemble des personnes qui ont des contacts étroits avec le patient tuberculeux doivent faire l'objet d'une attention particulière. Un virage tuberculinique témoin d'une contamination récente peut être recherché, une surveillance clinique au cours des mois qui suivent est recommandée, accompagnée de clichés radiologiques. C'est en effet au cours des mois qui suivent le contage que le risque d'évolution vers la tuberculose maladie est le plus grand.
En cas de suspicion d'infection et *a fortiori* en cas d'apparition de signes cliniques évocateurs, un traitement sera entrepris. Il sera à visée curative pour ce qui est de la maladie ou plus simplement prophylactique en cas de primo-infection. Dans le cas d'une primo-infection, le traitement fait appel le plus souvent à l'usage de l'isoniazide en monothérapie pour une période comprise entre 6 et 12 mois.

D. Vaccination

La prévention peut se faire grâce à la vaccination. Pour la tuberculose, le vaccin par le BCG (Bacille bilié de Calmette et Guérin) est obligatoire en France. Cette souche vaccinale a été obtenue à partir d'une mastite tuberculeuse dont souffrait une vache. Sa perte de virulence a été obtenue à la suite de repiquages répétés sur de la pomme de terre biliée et glycérinée. Son inoculation vaccinale entraîne une infection non cliniquement décelable qui diminue le risque de tuberculose extrapulmonaire, en particulier la redoutable méningite tuberculeuse.
Toutefois, l'évaluation de son taux de protection vis-à-vis de la tuberculose pulmonaire est semble-t-il moins évidente. Elle fait l'objet de très nombreuses études dont les résultats sont parfois divergents.
La diminution de l'incidence de la maladie dans les pays industrialisés qui ont mis en place cette vaccination est également due à l'amélioration des conditions sociales et économiques.
Cette vaccination n'est pas dénuée de risque. L'apparition d'une BCGite postvaccinale, heureusement peu fréquente, est à redouter.
L'Union internationale contre la tuberculose et les maladies respiratoires ne recommande pas la vaccination par le BCG pour les pays de faible prévalence qui possèdent une bonne maîtrise de la lutte antituberculeuse et un système déclaratif

performant. Actuellement, le rapport coût/bénéfice du vaccin plaiderait en faveur d'un arrêt de la vaccination en France. Cependant, à cause d'importantes disparités régionales et de sous-populations à risque identifiées, l'arrêt total de la politique vaccinale paraît inopportun.

Conclusion

La tuberculose pulmonaire est une infection chronique du poumon dont le diagnostic est délicat. Sur le plan biologique, des méthodes spécifiques doivent être mises en œuvre.
L'examen direct à la recherche de BAAR est le pied de voûte de tous les examens. La sensibilité du diagnostic s'est améliorée au cours des dernières années grâce à la mise en œuvre de nouvelles techniques.
Sur le plan thérapeutique, un traitement bien conduit, basé sur une polychimiothérapie prolongée, est la clé d'une guérison et de la non-apparition de souches résistantes.
Enfin, en plus du diagnostic et du traitement, la lutte contre la maladie doit veiller à la mise en œuvre de mesures préventives adaptées.

L'essentiel de la question

La tuberculose pulmonaire est le prototype de l'infection chronique pulmonaire. Elle est causée par trois espèces qui sont *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium africanum*.
L'infection peut également être extrapulmonaire, mais les formes pulmonaires sont celles qui sont les plus contagieuses. La quantité de bacilles dans les sécrétions bronchiques, qui peut être évaluée par un examen microscopique, est proportionnelle à la contagiosité du malade.
Le diagnostic biologique de la maladie est délicat et met en œuvre des méthodes de laboratoire adaptées et spécifiques.
Le traitement présente des particularités par l'usage d'une polychimiothérapie prolongée. Enfin, la mise en place de mesures préventives ne doit pas être oubliée lors de l'admission des malades dans une collectivité hospitalière.

Pour en savoir plus

- Accès Internet au Réseau national de santé publique : *http://www.rnsp-sante.fr*. À noter l'accès au *Bulletin d'épidémiologie hebdomadaire* (*BEH*) avec en particulier le document de synthèse et les recommandations des groupes de travail du Conseil supérieur d'hygiène publique de France.
- H. David, V. Lévy-Frébault, M.-F. Thorel. *Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique*. Collection de la Commission des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur, Institut Pasteur, Paris, 1989.

- E. Pilly. *Maladies infectieuses et tropicales.* Association des professeurs de pathologie infectieuse et tropicale, 2M2, Montmorency.
- *Le Référentiel en microbiologie médicale* (Rémic) par le groupe Rémic de la Société française de microbiologie. 2M2, Montmorency.

Bactériémies et endocardites

B. JOLY, Laboratoire de bactériologie, CHRU, Clermont-Ferrand.
A. COLLIGNON, Laboratoire de microbiologie, faculté de pharmacie, Châtenay-Malabry. (révision 2007)

La bactériémie et la fongémie correspondent à la présence de germes dans le sang, présence confirmée par l'isolement du germe en réalisant l'hémoculture.
En clinique, elles peuvent être asymptomatiques (les germes sont présents en petite quantité et transitoirement) ou au contraire s'accompagner d'un état infectieux sévère (les germes sont alors présents en masse et en permanence). Cet état infectieux est appelé couramment septicémie, mais ce terme est de moins en moins utilisé car il n'est pas assez précis. Il correspond en effet à deux situations cliniques différentes : un état bactériémique (ou fongémique) prolongé et un état infectieux plus ou moins sévère (allant du sepsis simple au choc septique).

I. Bactériémies : mécanisme et symptomatologie clinique

Le sang est normalement stérile. Sa contamination provient d'un foyer tissulaire de multiplication microbienne. À partir de ce foyer, les germes véhiculés par le sang vont pouvoir se fixer sur des tissus différents de celui du foyer. Il se crée ainsi des foyers secondaires ou métastases infectieuses qui peuvent aussi ensemencer le sang circulant. Sur le plan symptomatologique, une bactériémie est toujours marquée par de la fièvre (température > 38 °C) ou par une hypothermie (< 36 °C) souvent accompagnées de sueurs et de frissons.

Elle peut se compliquer :

- par un *sepsis*, c'est-à-dire une réponse inflammatoire systémique à l'infection. Il est caractérisé par au moins un des trois signes suivants :
  - fréquence cardiaque > 90/min,
  - fréquence respiratoire > 20/min, ou $PaCO_2$ < 32 mmHg,
  - leucocytes sanguins > 12 000/mm^3 (ou < 4 000/mm^3) ;
- par un *sepsis grave* : sepsis accompagné d'un dysfonctionnement organique, d'une hypotension ou d'une hyperperfusion ;
- par un *choc septique* ou choc infectieux : complication redoutable du sepsis dominée par une hypotension persistante et une hypoxie tissulaire aiguë. Il est caractérisé par deux phases : *la phase hyperkinétique* (choc chaud) qui correspond à un effondrement des résistances vasculaires périphériques par vasodilatation des capillaires et augmentation de leur perméabilité, *la phase hypokinétique* (choc froid) secondaire où le débit cardiaque est effondré et où survient une vasoconstriction cutanée, entraînant des marbrures et une froideur des extrémités. Les symptômes principaux sont rassemblés dans le *tableau 1*.

Tableau 1. Les symptômes du choc septique (d'après Le Popi, 1999)

Symptômes	Choc	
	Chaud (hyperkinétique)	Froid (hypokinétique)
Fréquence cardiaque	↑	↑↓
Pression artérielle	Normale ou pincée ou élevée	↓
Marbrures (genoux)	–	+
Extrémités	Chaudes	Froides
Insuffisance cardiaque clinique	–	+/–
Diurèse	Normale	< 20 mL/h

II. Bactériémies : schémas physiopathologiques

Les bactériémies sont divisées selon trois schémas physiopathologiques suivant leur point de départ et l'existence ou non d'un relais endocirculatoire.

Tableau 2. Schémas physiopathologiques des bactériémies (d'après PILLY E.)

Porte d'entrée	Foyer initial	Fièvre	Frissons	Décharges microbiennes	Densité	Virulence des germes	Évolution	Exemple
Cutanée ou muqueuse	Thrombophlébite septique	Oscillante	+++	Brutales	Forte	Très grande	Aiguë	Septicémie à staphylocoque
Digestive	Ganglions lymphatiques	Continue	Absents	Continues	Faible	Variable	Aiguë ou subaiguë	Fièvre typhoïde, brucellose
Bactériémie après soins dentaires, angines…	Endocarde	Continue et modérée	+/–	Continues	Faible	Faible	Subaiguë	Endocardite à streptocoque

A. Les bactériémies à point de départ thrombophlébitique

Une thrombophlébite colonisée par les germes se constitue au contact du foyer infectieux initial cutané ou muqueux (porte d'entrée) par réaction inflammatoire de l'endoveine. La fragmentation du caillot entraîne le passage périodique du germe dans le sang. Il se forme des localisations secondaires fréquentes dont les principales sont pulmonaires (abcès et pleurésies), ostéoarticulaires et endocarditiques. La fièvre est irrégulière (fièvre désarticulée).

Ce type de bactériémie est dû à des germes pyogènes qui évolue sur le mode aigu (forte densité de germes dont la virulence est élevée).

Les bactéries responsables sont variées ; il s'agit essentiellement de :

- *cocci à Gram positif* : staphylocoques – notamment *Staphylococcus aureus* (staphylococcémies) –, streptocoques – surtout ceux du groupe D–, pneumocoques ;
- *bacilles à Gram négatif* : entérobactéries, dont le colibacille et le groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* ;
- *bactéries anaérobies* strictes, surtout *Bacteroïdes fragilis*.

B. Les bactériémies à point de départ lymphatique

Dans ce cas, les germes se multiplient dans les macrophages d'un ganglion drainant le territoire de la porte d'entrée (phase intracellulaire de la multiplication). La porte d'entrée est souvent digestive, les bactéries traversent la muqueuse intestinale et se multiplient dans les ganglions mésentériques.
La diffusion sanguine se fait à partir des ganglions infectés par l'intermédiaire des vaisseaux lymphatiques. Elle est lente, progressive, et met en jeu peu de bactéries. Ce type de bactériémie est donc moins aigu que le précédent ; les phases d'incubation et d'invasion sont plus longues et les métastases septiques plus rares. Les bactéries qui restent dans les ganglions sont souvent lysées, ce qui libère dans le sang leur endotoxine. Cela a pour conséquences des chocs endotoxiniques fréquents et une fièvre de plus en plus élevée.
Les germes en cause sont des bactéries spécifiques qui déterminent un syndrome spécifique : il s'agit par exemple de la typhoïde dans le cas de *Salmonella typhi* ou de *Salmonella paratyphi* A ou B, et de la brucellose dans le cas des *Brucella*.

C. Les endocardites

Les germes (streptocoques et staphylocoques essentiellement) gagnent le sang à partir d'un foyer muqueux ou dentaire et colonisent un coagulum de fibrine au niveau de l'endocarde lésé (surtout de l'endocarde valvulaire qui est mal vascularisé) ou d'un matériel étranger. Il se forme une végétation endocarditique qui constitue le foyer infectieux. Les germes ou leurs toxines sont libérés progressivement et en permanence dans le sang à partir de ce foyer. La fièvre, généralement peu élevée, est permanente. La virulence des germes est faible et l'évolution se fait sur le mode subaigu.
Il s'agit essentiellement d'endocardite, due généralement à des streptocoques du groupe D ou non groupables. Dans la végétation, les bactéries sont parfois défectives et sont peu accessibles aux défenses naturelles et aux antibiotiques.

D. Autres situations possibles

- Complications d'une infection localisée (pneumopathie, ostéomyélite, péritonite…) ou d'une pathologie digestive ou obstétricale.
- Bactériémies chez les immunodéprimés (granulopénie, lymphopénie ou Sida).
- Bactériémies postchirurgicales (chirurgie viscérale), après ablation dentaire ou après exploration instrumentale.

III. Étiologies des bactériémies

Les bactériémies sont dues à des bactéries très variées. Cependant, à un germe donné, correspondent souvent des éléments caractéristiques, notamment : signes cliniques, âge, situations (*tab. 3*) et terrain (*tab. 4*). Ces éléments permettent de mettre en route le plus précocement possible l'antibiothérapie de présomption adaptée au germe suspecté, quand la situation le commande.

A. Signes cliniques

Courbe thermique

Une fièvre oscillante est généralement due à une entérobactérie (colibacille, *Proteus*...) ; une fièvre en plateau évoque la typhoïde ; une fièvre ondulante évoque la brucellose.

Signes associés

Rash scarlatiniforme (streptocoques, staphylocoques), pneumopathie focalisée (pneumocoque) ou abcédée (klebsielles, anaérobies stricts), méningite purulente (méningocoque, pneumocoque), tuphos (*Salmonella typhi* ou *Salmonella paratyphi* A ou B), souffle cardiaque (streptocoques), ictère rétentionnel (entérobactérie), ictère + érythème + insuffisance rénale (leptospires).

B. Âge

Chez le nouveau-né, le risque de bactériémie est important en particulier la première semaine. Les germes les plus fréquents sont les entérobactéries dont le colibacille. Il peut s'agir aussi de bactéries particulières dont le streptocoque B et *Listeria monocytogenes*.
Chez l'enfant, les germes les plus fréquents sont d'origine respiratoire : pneumocoque, *Haemophilus influenzae b*, méningocoque qui peut être responsable de formes gravissimes : *Purpura fulminans*. Le staphylocoque pathogène est le plus fréquent à partir de l'âge scolaire.
Chez l'adolescent et l'adulte jeune, l'étiologie dépend des circonstances (par exemple, chez les héroïnomanes, il s'agit des staphylocoques et des *Candida*). Les étiologies peuvent aussi être liées à l'activité professionnelle (brucelles dans le cas des éleveurs de bétail...) ou de loisirs (leptospire ou salmonelle dans le cas de baignades ou de voyages respectivement).

C. Situations

Tableau 3. Agents étiologiques probables des bactériémies (d'après PILLY E.) selon les situations

Site	Facteurs favorisant et déclenchant	Germes probables
Peau	Traumatisme (plaies et brûlures). Ischémie, cathéter veineux, aiguille (toxicomanie)	Staphylocoques Bacilles à Gram négatif Streptocoques
Tube digestif	Tumeurs, diverticulose, hypertension portale, colite Toxi-infection alimentaire collective Chirurgie	Entérobactéries (*Salmonella, Escherichia coli*) Streptocoques D Anaérobies stricts
Voies biliaires	Lithiase. Cathétérisme rétrograde, chirurgie	**Entérobactéries** (*Escherichia coli, Klebsiella*), *Pseudomonas*
Poumon	Alcoolisme. Sujet âgé	Pneumocoque *Klebsiella pneumoniae*
Endocarde	Valvulopathie. Infection dentaire Cathéter veineux, aiguille (toxicomanes)	**Streptocoques** (entérocoques) Staphylocoques
Voies urinaires	Obstacle sur voies excrétrices, grossesse Manipulation instrumentale, sonde vésicale à demeure, chirurgie	**Entérobactéries** (*Escherichia coli*) *Pseudomonas*
Vasculaire	Alimentation parentérale. Cathéters, aiguilles (toxicomanes)	Staphylocoques Streptocoques Bacilles à Gram négatif

D. Terrain

Tableau 4. Agents étiologiques probables des bactériémies selon le terrain (d'après PILLY E.)

Terrain	Germes probables
Splénectomie	Pneumocoque – *Haemophilus* – Entérobactéries
Myélome	Pneumocoque
HIV	Pneumocoque – Mycobactéries atypiques – *Salmonella*
Voyage récent hors métropole	Salmonella
Hémoglobinopathie	Salmonella
Aplasie médullaire	Entérobactéries – *Pseudomonas* – Staphylocoques – Streptocoques
Alcoolisme	Pneumocoque – *Klebsiella pneumoniae*
Profession exposée (vétérinaire)	Brucella
Malade hospitalisé	Bactéries multirésistantes
Grossesse	Listeria

IV. Diagnostic clinique d'un état bactériémique (ou fongémique)

Un état bactériémique est évoqué devant tout épisode fébrile, en particulier quand il survient chez des personnes à risque (sujet porteur d'une prothèse valvulaire ou venant de subir une intervention chirurgicale viscérale ou des soins dentaires, patient cathétérisé, drogué, sujet immunodéprimé…).
Le diagnostic clinique repose sur trois faisceaux d'éléments :

- *Des signes généraux graves très évocateurs* : *fièvre* de caractère variable mais élevée et constante ; état de choc infectieux, asthénie, oligurie ou anurie.
- *Des signes cliniques de confirmation* tels que splénomégalie, éruptions cutanées.
- *L'existence d'une porte d'entrée* : elle peut être cutanée ou muqueuse (angine, avortement), digestive (chirurgie), vasculaire (cathéter).

V. Diagnostic biologique d'un état bactériémique (ou fongémique)

Il est fondamental car il permet d'affirmer la présence de germe, d'en préciser l'étiologie (identification du germe) et de guider le traitement.
Dans ces circonstances, des dispositions indispensables sont nécessaires, en particulier : une confrontation clinicobiologique, la transmission en urgence des résultats même partiels, l'utilisation de méthodes donnant les résultats le plus rapidement possible (intérêt des automates).
Le diagnostic est bactériologique (ou fongique dans les cas où le germe responsable est une levure). Il repose sur l'isolement du germe dans le sang du malade (*hémoculture*) et éventuellement au niveau de la porte d'entrée et des foyers secondaires, son identification et l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques.

A. Hémoculture

L'hémoculture consiste à la mise en culture répétée du sang du malade. Ses indications sont variées. Elle s'impose devant tout malade présentant une fièvre isolée ou associée à des conditions particulières, ainsi que devant d'autres situations bien définies (infections localisées sévères, souffrance néonatale...).

1. Réalisation de l'hémoculture

Le prélèvement de sang est effectué le plus précocement possible et si possible avant l'instauration de l'antibiothérapie (sauf dans le cas où il s'agit de contrôler l'efficacité du traitement).

Le sang est prélevé au lit du malade généralement par ponction veineuse périphérique, plusieurs fois par jour au moment des pics fébriles ou systématiquement à intervalles réguliers (2 ou 3 prélèvements peuvent être ainsi effectués par 24 heures). Le site cutané de la ponction ou le cathéter sont désinfectés soigneusement (alcool iodé). Le sang est recueilli stérilement à l'aide d'un dispositif de prélèvement (tubulure montée de deux aiguilles) qui relie la veine ou le cathéter au flacon contenant un milieu de culture adapté (ce matériel est fourni par le laboratoire). Le recueil du sang est réalisé pour chaque prélèvement dans deux flacons différents, l'un d'entre eux assure les conditions aérobies optimales pour les germes nécessitant de l'oxygène pour leur croissance, l'autre assure les conditions anaérobies nécessaires aux germes anaérobies stricts. Chez l'adulte, on prélève 20 mL de sang répartis également dans chacun des flacons.

NB : Une hémoculture correspond ainsi aux deux flacons (l'un aérobie, l'autre anaérobie) contenant le sang du patient prélevé à un moment déterminé.

Le milieu contenu dans le flacon d'hémoculture est généralement liquide (bouillon), c'est le cas des systèmes d'hémocultures automatisés. Le milieu peut également être semi-gélosé, voire biphasique (méthode de Castaneda). Il apporte les éléments nécessaires à la culture de la plupart des bactéries pathogènes, c'est le cas par exemple du bouillon cœur-cerveau ou trypticase-soja pour les flacons aérobies et du bouillon au thioglycolate pour les flacons anaérobies. Il est additionné d'un anticoagulant, d'inhibiteurs du pouvoir bactéricide du sérum et de neutralisants des antibiotiques (bêtalactamase inhibant les bêtalactamines...). Pour certaines bactéries (leptospires, bactéries déficientes...), des milieux spéciaux ou des additifs supplémentaires sont nécessaires.

L'atmosphère dans les flacons est constituée de 10 % de CO_2 et de 90 % d'azote, un vide partiel préexiste. Ainsi, le conditionnement des flacons est anaérobie et le vide partiel à l'intérieur permet l'introduction du sang. Après apport du sang, l'atmosphère est rendue aérobie dans le flacon destiné à la culture en aérobiose en introduisant stérilement de l'air.

Dès que le prélèvement est réalisé, les deux flacons étiquetés soigneusement sont apportés le plus rapidement possible au laboratoire en s'efforçant de les maintenir à une température la plus proche possible de 37 °C. Sur l'étiquette sont indiquées l'identification du patient, l'heure du prélèvement et la température du patient au moment du prélèvement.

Note : Dans certains cas, le sang est prélevé sous vide et sur anticoagulant (système Vacutainer), il est alors ensemencé directement au laboratoire sur les milieux de cultures appropriés. Par ailleurs, il est également possible d'utiliser un système de centrifugation-lyse (système Isolator), très performant pour isoler les germes de croissance difficile ou intracellulaires.

2. Examen au laboratoire des flacons d'hémoculture

Les flacons d'hémoculture sont placés à 37 °C à l'étuve ou dans l'incubateur de l'automate dès leur arrivée au laboratoire. Ils sont incubés pendant au moins 6 jours et examinés plusieurs fois jour (voire en permanence lorsqu'ils sont pris en charge par un automate) de manière à mettre en évidence le plus rapidement possible la présence de germes.
Habituellement, l'hémoculture se positive (présence de germes dans les flacons) entre 1 et 3 jours.
L'examen comprend la détection et la confirmation de la présence de germe dans le bouillon contenu dans le flacon et la « subculture ».

a) Détection d'une croissance microbienne

Avec les méthodes manuelles, cette recherche se fait par observation macroscopique : l'aspect du milieu de culture (bouillon trouble, sang hémolysé ou laqué, bulles de gaz) ou la présence de colonies sur la gélose dans le cas de milieux biphasiques permettent de repérer une croissance microbienne sans ouvrir le flacon (ce qui évite les contaminations). *Avec les méthodes automatiques,* des capteurs décèlent au niveau de chaque flacon les indices d'une croissance microbienne (le signal détecté varie suivant les constructeurs, le but étant de déceler spécifiquement une culture la plus précocement possible, quel que soit le germe en cause).

b) Confirmation de la présence de micro-organismes

Le bouillon détecté positif est observé au microscope (état frais et coloration de Gram) après ponction à la seringue à travers le bouchon du flacon. Il est également ensemencé sur des milieux de culture adaptés au germe observé. *Cette subculture* est systématique dès qu'un doute sur la positivité existe.

c) Réalisation de la subculture

La subculture est réalisée en inoculant le bouillon sur des milieux gélosés de manière à obtenir des colonies isolées du germe. Elle est effectuée dans les circonstances suivantes :
- dès que la présence de germe est détectée et/ou confirmée ;
- en cours d'incubation, dès que la nécessité apparaît.

d) Transmission des résultats provisoires au clinicien

En cas de positivité d'un examen microscopique, le clinicien s'occupant du patient concerné est immédiatement alerté. Les renseignements suivants lui sont donnés :
- le nombre de flacons positifs chez le patient au moment de l'appel ;
- la morphologie et le type de coloration de Gram des bactéries.

Ce premier résultat permet d'adapter le traitement de première intention initié chez le patient ou d'orienter le choix du traitement à entreprendre. Il n'est que provisoire et sera complété grâce à l'examen des subcultures qui est beaucoup plus précis mais dont l'obtention des résultats peut nécessiter plusieurs jours.

3. Examen des subcultures

Si un germe est présent dans un flacon, sa subculture sur des milieux gélosés enrichis est généralement obtenue sous forme de colonies caractéristiques après 24 ou 48 heures d'incubation. L'examen des colonies (coloration de Gram, catalase, oxydase, besoin ou non en oxygène…) permet de préciser le germe en cause : il est possible d'en déterminer le genre ou la famille (staphylocoque, streptocoque, entérobactérie…) et donc de préciser les résultats préliminaires donnés au clinicien. Il permet aussi de pousser l'identification au niveau de l'espèce en réalisant à partir des colonies des galeries d'identification adaptées et de réaliser un antibiogramme comportant les antibiotiques potentiellement actifs sur la bactérie en cause.
À la suite de ces examens, *un résultat bactériologique définitif* sera transmis au clinicien : *il décrit l'espèce bactérienne contenue dans le flacon et sa sensibilité aux antibiotiques*.
Note : dans le cas où le sang est envoyé directement au laboratoire (systèmes Vacutainer ou Isolator, par exemple), il sera inoculé dans des milieux riches gélosés et/ou dans des bouillons de culture appropriés.

B. Mise en évidence des germes au niveau de la porte d'entrée et de foyers septiques secondaires

Des prélèvements périphériques divers sont réalisés si possible avant antibiothérapie pour localiser la porte d'entrée (cathéter, lésion cutanée, prélèvement pharyngé…) et au niveau de foyers septiques secondaires (ponction lombaire, ponction pleurale, ponction articulaire, ponction de vésicules cutanées…). Ces prélèvements sont étudiés et mis en culture au laboratoire. Les germes qu'ils contiennent sont identifiés et comparés à ceux trouvés dans les hémocultures. Cette comparaison apporte dans certains cas des éléments importants pour l'interprétation des résultats des hémocultures.

C. Interprétation des résultats

Les résultats de l'hémoculture sont interprétables après le délai requis pour la culture et l'identification de la bactérie. Trois cas principaux sont schématiquement distingués.

1. Plusieurs hémocultures réalisées successivement chez le même malade sont positives et il s'agit dans tous les flacons du même germe

La signification clinique du germe est dans ce cas certaine, il est considéré comme responsable. Il s'agira généralement (environ 90 % des cas) de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, d'entérobactéries autres

que *Escherichia coli*… Il pourra s'agir aussi de germes considérés la plupart du temps comme peu, voire non pathogènes (staphylocoques coagulase-négatifs, streptocoques non hémolytiques…).

Dans certains cas (foyer polymicrobien, origine digestive, cathéter longtemps maintenu en place, malades immunodéprimés ou en phase agonique), deux voire trois bactéries différentes peuvent être trouvées. Parmi elles, celles qui sont isolées au niveau d'un foyer localisé sont considérées comme responsables, le traitement antibiotique doit être adapté en priorité à cette ou ces bactéries.

2. Une seule hémoculture est positive sur l'ensemble de celles réalisées chez le malade

La signification clinique du germe isolé est alors discutable :

- s'il s'agit d'une bactérie dont le pouvoir pathogène est évident (*Salmonella typhi*, *Brucella spp.*, streptocoque du groupe A, méningocoque, pneumocoque…), elle est généralement considérée comme responsable ;
- s'il s'agit d'une bactérie fréquemment responsable de contaminations (staphylocoques coagulase-négatifs, *Bacillus*, corynébactéries commensales, *Propionibacterium*, *Neisseria* saprophytes, streptocoques alpha-hémolytiques ou non hémolytiques…), elle est alors généralement considérée comme un contaminant.

3. Toutes les hémocultures sont négatives

Il s'agit alors d'un argument très fort pour éliminer une cause infectieuse (bactérie ou levure). Cela n'est valable que dans la mesure où le sang a été correctement prélevé (aux bons moments et avec des répétitions suffisamment nombreuses) et la culture parfaitement réalisée.

Toutefois, il est des cas ou l'hémoculture peut être faussement négative :

- prélèvements effectués trop tardivement au cours de la maladie ;
- prélèvements réalisés alors qu'une antibiothérapie est mise en route. Ce risque d'échec est assez fréquent quoiqu'il existe des moyens de l'éviter. En effet, d'une part, l'effet inhibiteur des antibiotiques contenus dans le sang peut être neutralisé par dilution dans le bouillon de culture contenu dans les flacons et par des additifs incorporés au bouillon (bêtalactamases, résines…) ; d'autre part, l'antibiothérapie peut être interrompue momentanément (fenêtre thérapeutique) ;
- conditions de culture défectueuses : quantité trop faible de sang dans les flacons, milieux et conditions de culture ne convenant pas au germe en cause (bactéries déficientes, mycobactéries, leptospires…), durée d'observation insuffisante ;
- foyers infectieux ne larguant pas les bactéries viables dans le sang.

Les causes des échecs, rapportés ci-dessus, montrent l'importance de la bonne mise en œuvre de toutes les étapes de l'hémoculture et les précautions toutes particulières qui doivent entourer la réalisation de cet examen. Rappelons enfin que la recherche d'antigènes solubles peut s'avérer utile quand le sang ne contient plus que les antigènes bactériens.

VI. Traitement des bactériémies

Le traitement d'une septicémie est basé sur une antibiothérapie précoce, massive et adaptée au germe responsable ainsi que sur une thérapeutique non antibiotique, en fonction des cas individuels.

A. Traitement antibiotique

Il est instauré dès que les prélèvements sont réalisés. Il est d'abord probabiliste puis électif quand le germe responsable est identifié et sa sensibilité aux antibiotiques déterminée. Dans les deux cas, l'antibiothérapie est fonction de l'âge, de l'état fonctionnel des émonctoires (foie, rein) et de la toxicité potentielle des molécules utilisées.

1. Le traitement probabiliste

Dès la réalisation des prélèvements, le traitement antibiotique est instauré avant que le germe responsable soit identifié. Cependant, le choix des antibiotiques peut être guidé par la connaissance du foyer infectieux qui a occasionné l'état septicémique (cellulite, pneumonie, suppurations abdominales…) et les éléments de prédiction (*cf. supra*).
Si aucune infection initiale ne permet d'orienter le traitement, une antibiothérapie à large spectre est alors utilisée. Elle est réalisée en monothérapie ou par la combinaison de deux antibiotiques bactéricides, par exemple celle de bêtalactamines et d'un aminoside (ou d'une fluoroquinolone), quand la septicémie a été contractée à l'hôpital. Une monothérapie peut être suffisante (bêtalactamine, glycopeptide, fluoroquinolone…), quand la septicémie s'est déclarée en dehors de l'hôpital.

2. Le traitement électif

Dès que le germe responsable est connu, l'antibiothérapie est adaptée en tenant compte d'une part du germe lui-même et de sa sensibilité *in vitro* (antibiogramme), et d'autre part de l'évolution clinique de la maladie. Dans les cas complexes (gravité, souches multirésistantes), il est fait recours à des données complémentaires : les CMI et CMB des antibiotiques utilisables et les cinétiques de bactéricidie des associations de deux antibiotiques notamment.
L'efficacité du traitement peut être contrôlée à tout moment grâce, d'une part, à l'étude du pouvoir bactéricide du sérum du malade vis-à-vis de la souche microbienne responsable et, d'autre part, à la réalisation d'hémocultures dites « de contrôle », qui doivent être négatives.
Le dosage sérique des antibiotiques utilisés permet d'adapter en cours de traitement les posologies et les rythmes d'administration de manière à éviter d'atteindre les doses toxiques en cas de surcharge, notamment dans le cas des aminosides et des glycopeptides.

B. Traitement associé

Il comporte la surveillance et la prise en charge des fonctions vitales du patient ainsi que l'éradication de la porte d'entrée ou d'un foyer.

1. Mesures contre le choc infectieux

Le choc septique est prévenu en assurant l'hydratation et l'équilibre électrolytique du malade et en maintenant une bonne oxygénation.

Si un choc survient, les mesures principales suivantes sont prises :

- remplissage du lit vasculaire par perfusion de solutés de très grosses molécules qui seront bien retenues dans le secteur vasculaire (Macrodex...), et en alternance de solutés salés et glucosés ou de sang total (en cas d'anémie associée). Les quantités requises sont contrôlées par la pression veineuse centrale (PVC), qui devrait être amenée au niveau de 10 cm d'eau sans dépasser 15 cm ;
- correction des anomalies de distribution du sang par des agents vaso-actifs : bêta-adrénergiques (type dopamine) utilisés après remplissage correct ;
- correction de l'acidose éventuelle (bicarbonates) ;
- établissement d'une bonne oxygénation (oxygénothérapie, ventilation assistée).

2. Éradication de la porte d'entrée ou d'un foyer

Quand la porte d'entrée ou les foyers secondaires sont mal contrôlés ou inaccessibles aux antibiotiques, ils peuvent être éliminés par voie chirurgicale.
Les abcès ou suppurations sont drainés.
Les cathéters infectés ou le corps étranger (prothèse, stimulateur cardiaque...) sont retirés.

VII. Examens complémentaires selon l'évolution

La persistance de la fièvre malgré le traitement nécessite les examens complémentaires suivants :

- *vérification de l'évolutivité de l'infection* : répétition des hémocultures et des prélèvements périphériques au niveau des sites infectés ; surveillance de la leucocytose et du syndrome inflammatoire ; recherche de localisations inaccessibles aux antibiotiques ;
- *contrôle de l'efficacité du traitement antibiotique* ;
- *recherche d'une complication iatrogène* : veinite, infection nosocomiale, intolérance médicamenteuse...
- *recherche d'une cause non infectieuse* : thrombose...

VIII. Exemples de bactériémies

A. Bactériémie à bacilles à Gram négatif

Ces bactériémies sont fréquentes et surviennent lors de complications (généralement iatrogènes) chez des maladies traitées pour une affection déjà grave par elle-même. Les immunodéprimés sont particulièrement exposés.
Les étiologies sont des BGN n'ayant pas de pouvoir pathogène spécifique. Ils appartiennent à la famille des entérobactéries (le colibacille d'abord, qui est le plus fréquent, puis les genres *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*...) ou

à d'autres groupes bactériens (en particulier les espèces *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumanii*). En milieu hospitalier, lors d'une infection acquise à l'hôpital, ces bactéries peuvent être résistantes à la plupart des antibiotiques usuels. La gravité de ce syndrome est liée au risque et à la fréquence du choc endotoxinique et des localisations secondaires. Le traitement doit être le plus spécifique possible du germe responsable et actif au niveau des foyers secondaires et de la porte d'entrée. Dans certains cas, il est très difficile à réaliser efficacement (celui d'une bactérie multirésistante chez un malade neutropénique ayant des foyers secondaires profonds est l'un des plus délicats).

B. Bactériémie à staphylocoques (staphylococcémies)

Cet état infectieux est fréquent surtout en milieu hospitalier. Il s'observe à tout âge, généralement sur un terrain favorisant. La porte d'entrée est variée mais surtout cutanée.
L'espèce responsable est dans la plupart des cas *Staphylococcus aureus*. Il peut s'agir aussi des staphylocoques coagulase-négatifs, en particulier de *Staphylococcus epidermidis*, quand il existe un corps étranger (cathéter, prothèse…). Ces bactéries peuvent être multirésistantes aux antibiotiques.
Cliniquement, il peut exister des formes fulminantes aiguës (choc septique staphylococcique). Généralement, les formes sont du type septico-pyohémique accompagnées de manifestations cutanées caractéristiques (« pustulose hémorragique des extrémités »). L'évolution est marquée par l'apparition d'atteintes métastatiques viscérales dont la localisation est caractéristique (pleuropulmonaire, osseuse – en particulier chez le nourrisson –, cardiaque – endocardite –, nerveuse, génito-urinaire). Il existe aussi des formes lentes évoluant pendant de nombreux mois.
Le pronostic est souvent sévère, surtout quand il existe une maladie sous-jacente grave elle-même. La mortalité peut atteindre 30 ou 40 % quand il s'agit de *Staphylococcus aureus*. Le pronostic est meilleur dans le cas de *Staphylococcus epidermidis*, surtout quand le corps étranger favorisant a été retiré.

C. Bactériémie à germes spécifiques

Il s'agit des maladies infectieuses caractéristiques qui comportent dans leur évolution une phase bactériémique (typhoïde, brucellose, endocardite, gonococcémie…). Cette phase ne constitue qu'une partie du syndrome infectieux, son existence ne peut être dissociée de celle de la totalité de la maladie.

L'essentiel de la question

Les bactériémies se caractérisent toujours par une fièvre (ou une hypothermie) accompagnée le plus souvent de signes évocateurs et plus ou moins spécifiques d'une infection. Il peut survenir de graves complications : sepsis grave, choc septique, endocardite. La contamination du sang se produit à partir d'un foyer infectieux localisé duquel le germe essaime par voie sanguine (point de départ thrombophlébitique) ou par voie lymphatique (point de départ ganglionnaire).

Schématiquement, on différencie trois grands types de bactériémie en fonction de l'étiologie : à bacilles à Gram négatif (en particulier *Escherichia coli*), à staphylocoques, à germes spécifiques (typhoïde, brucellose, endocardite...).
L'hémoculture est l'examen de choix à réaliser dès qu'une bactériémie (fongémie) est suspectée. Elle permet d'affirmer l'étiologie (micro-organisme en cause) et d'orienter l'antibiothérapie. Le prélèvement de sang doit être réalisé avec soin : éviter les contaminations et travailler en sécurité, prélever suffisamment de sang (au moins 20 mL chez l'adulte), effectuer plusieurs prélèvements successifs. Les conditions de culture doivent être optimales (qualité des milieux, durée d'incubation).
La détection d'une croissance bactérienne doit être la plus rapide possible (intérêt des automates) car elle permet de transmettre en urgence un résultat partiel portant sur le micro-organisme décelé (morphologie, coloration de Gram...) et sur le nombre de flacons positifs. L'isolement du germe, son identification précise et l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques sont indispensables en raison de la grande variété des micro-organismes possibles.
Le traitement est basé d'une part sur une antibiothérapie précoce, massive et adaptée au germe responsable, et d'autre part, sur la prise en charge des fonctions vitales du patient (en particulier dans le cas d'un choc infectieux) et sur l'éradication de la porte d'entrée.

Pour en savoir plus

- Pilly E. *Maladies infectieuses*, C et R, 17e édition, 2000.
- SFM. Rémic, Référentiel en microbiologie médicale, 2004.
- Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. Précis de bactériologie clinique, édition Eska, Paris 2007.

Infections urinaires

A. COLLIGNON (révision 2007), C. HOMBROUCK, J.-C. TORLOTIN
Laboratoire de microbiologie, hôpital Jean Verdier, Bondy.

Le concept de syndrome urinaire s'appuie sur un large éventail de constatations cliniques et/ou biologiques. Il intéresse tous les âges, hommes et femmes confondus. Il s'exprime au travers de symptômes, parfois isolés, aussi variés et variables que brûlures mictionnelles, dysurie, pollakiurie, pesanteur pelvienne, fièvre, douleurs lombaires, altération de l'état général, hématurie, qui tous traduisent la souffrance d'un organe appartenant à l'appareil génito-urinaire. Il arrive aussi que l'attention soit uniquement attirée par une anomalie biologique, telle la découverte fortuite d'une pyurie ou d'une albuminurie.

Une fois ce syndrome reconnu, il importe d'en préciser la signification, c'est-à-dire d'en établir l'étiologie. De toutes les manifestations irritatives du tractus urinaire, celles qui relèvent de l'infection tiennent une place particulière tant par leur fréquence majoritaire que par les conséquences fonctionnelles qu'elles risquent d'entraîner, lorsqu'elles sont négligées, tout particulièrement chez l'enfant et la femme enceinte.

À ce titre, il est avéré que la contribution du laboratoire de microbiologie est décisive en authentifiant l'infection, en isolant l'espèce et en déterminant sa sensibilité aux antibactériens. Il ne permet pas de faire la distinction entre une infection haute ou basse, seuls la clinique et les examens complémentaires (hémocultures...) y contribuent.

I. Fréquence de l'infection

Toutes formes confondues, l'infection urinaire représenterait 1 à 2 % des motifs de consultations d'un généraliste. Pour les seules dysuries, on admet 15 à 20 000 cas/10^6 habitants/an, ce chiffre recouvrant en réalité des situations diverses.

A. En fonction du sexe

L'infection affecte ***plus souvent la femme que l'homme***. Pour une même tranche d'âge, de 15 à 65 ans, évaluée à 1,8 ‰ par année chez l'homme, l'incidence est en moyenne dix fois plus élevée chez la femme (ce qui semble dû à l'urètre court).

B. En fonction de l'âge

Bien que commun à tout âge, cet accident survient plus fréquemment à certaines périodes de la vie.

1. Chez l'enfant

L'incidence vient au 2e rang, juste après celle intéressant les voies respiratoires.
Elle est de 0,7 % entre 5 et 9 ans. Au cours de la première année de vie, l'inégalité des sexes se trouve curieusement inversée. Globalement au taux de 0,5 % chez les fillettes s'oppose celui de 2,5 % pour les garçons. Une étude affinée montre même qu'avant un mois, le garçon est majoritairement concerné : immaturité, phimosis physiologiques ?

2. Chez la femme

Le taux décroît de la trentaine à la ménopause pour augmenter alors et atteindre des valeurs élevées. Entre 65 et 70 ans, 15 à 20 % des femmes présenteraient une bactériurie asymptomatique (contre 0 à 3 % des hommes) et après 80 ans jusqu'à 50 % (contre 5 à 20 %).

3. Chez l'homme jeune (entre 20 et 40 ans)

Il s'agit en fait, la plupart du temps, de prostatite. À partir de la cinquantaine, l'infection est favorisée par un résidu vésical, une sclérose du col vésical, une polypose vésicale.

C. En fonction de situations à risque

- La *grossesse* au cours de laquelle les conséquences peuvent être doublement dramatiques : pyélonéphrite aiguë maternelle, infection néonatale, prématurité, hypotrophie. En cours de grossesse, la prévalence de ces bactériuries évolue selon les auteurs de 3 à 20 %, prévalence plus élevée chez la femme primipare et augmentant avec l'âge gestionnel. Même en présence de bactériurie asymptomatique, le traitement s'imposera car le risque de développer soit un accident aigu, soit une nécrose papillaire évoluant à bas bruit, est de 50 %.
- Le *diabète*, plus particulièrement chez la femme, trois fois plus exposée.
- L'*état grabataire*, aggravé par l'incontinence et les troubles psychiques.
- Une *uropathie sous-jacente*.
- Une *immunodépression*.

II. Symptomatologie

On peut distinguer deux entités cliniques correspondant à deux sites d'infection :

A. La cystite

Isolée, témoin d'une *infection basse* où la pullulation microbienne est limitée à la paroi vésicale et à l'urine, elle se caractérise par des brûlures mictionnelles, pollakiurie, parfois hématurie. La température est généralement normale ou ne dépasse pas 38 °C.

B. La pyélonéphrite aiguë

Elle affecte le *parenchyme rénal*. Elle est caractérisée par une fièvre supérieure à 38,5 °C, d'installation souvent brutale, transitoire. Des douleurs lombaires ou abdominales avec palpation d'un gros rein, volontiers douloureux, plaident en faveur de cette localisation. Chez le petit enfant, ces symptômes spécifiques se font plus discrets. De même, chez l'adulte, l'absence de fièvre et de lombalgie ne garantie pas la limitation de l'infection à la vessie et, dans nombre de cas, l'examen sys-

tématique des urines peut révéler l'existence d'une infection authentique alors que la clinique est parfaitement muette. Rappelons que durant la grossesse, cette symptomatologie est éminemment variable et trompeuse.
Schématiquement, les affections de l'arbre urinaire se répartissent en cystite (50 %), pyélonéphrite (30 %) et bactériurie asymptomatique (20 %). La distinction infection vésicale/rénale (et prostatique) n'est pas de pure forme, en effet, elle conditionne à la fois les modalités de traitement et la surveillance de l'évolution.
De plus, il importe de préciser s'il s'agit d'une infection survenant chez un patient dont les voies excrétrices sont normales et ne présentant pas de facteurs aggravants. Le risque de retentissement rénal chez la femme non gravide est évalué à 2 %. Mais ce risque devient important pour peu que des lésions obstructives existent à quelque niveau que ce soit (lithiase, adénome prostatique, stase, reflux vésico-urétéral…). Elles seront révélées par échotomographie, voire urographie.
De même, la pyélonéphrite aiguë comporte toujours le risque gravissime de passer à la chronicité (40 % des insuffisances rénales chroniques ou IRC dérivaient autrefois d'accidents infectieux méconnus ou mal traités). Le second risque, immédiat est la septicémie. Toute pyélonéphrite représente donc une urgence médicale, surtout chez le nourrisson.
Dans tous les cas, la non-réponse, chez l'adulte, au traitement anti-infectieux, ou la notion de récidive précoce associée au caractère hématurique d'une cystite, doit attirer l'attention sur l'éventualité d'une malignité. L'inflammation péritumorale joue un rôle essentiel en déterminant une instabilité vésicale s'exprimant sur forme d'impériosité mictionnelle.

III. Physiopathologie

A. La voie ascendante

Elle semble constituer la voie prépondérante dans l'installation de l'infection :
- par *reflux vésico-urétéral* pour le rein ;
- par *cheminement urétral* pour le bas appareil.

Les espèces bactériennes les plus souvent en cause sont représentatives de la flore colique aérobie. Elles colonisent normalement le périnée, le vestibule vulvaire chez la femme. Par contiguïté, la muqueuse du conduit urétral en abrite quelques espèces, tout au moins le long du tiers externe. La possibilité physiologique que se constitue un reflux liquidien vagino-urétro-vésical a été démontrée. La contamination vésicale semble donc quasi habituelle, du moins à bas niveau. Les défenses naturelles suffisent habituellement à limiter l'implantation et le développement microbien, qu'elles agissent par effet chimique (pH de la muqueuse franchement acide), mécanique (vidange vésicale, péristaltisme de la muqueuse lisse urétrale), immunologique, macrophagique.
Cependant, toutes les circonstances qui modifient l'équilibre de la flore, qui favorisent la pullulation, qui contrarient l'activité de défense, favoriseront le déclenchement de l'infection.

Ainsi s'explique le rôle favorisant, déclenchant de :

- reflux massif ;
- stase et obstruction qui laissent un résidu postmictionnel (lithiase, malformation congénitale, hypertrophie prostatique, relâchement périnéal, lésions tumorales, inflammatoires – tuberculose, bilharziose –, neurologiques) ;
- cathétérisme des voies urinaires ;
- immunodépression ;
- dysmétabolisme : glycosurie, alcalinisation ;
- restriction hydrique ou mictionnelle ;
- rapports sexuels ;
- hygiène périnéale défectueuse : excessive ou agressive (bain moussant, spray perturbant l'équilibre au profit d'espèces résistantes) ; insuffisante ou mal appliquée (toilette erronée d'arrière en avant) ;
- mode de vie favorisant la macération (port de vêtement ajusté).

B. La contamination descendante

La contamination descendante ou voie hématogène est possible mais limitée à des circonstances rares (anthrax du rein ou de la prostate, tuberculose, septicémie).

IV. Diagnostic biologique : l'examen cytobactériologique des urines

Seul cet examen authentifie l'infection urinaire. En effet, les signes cliniques sont souvent imprécis tout comme la description présentée par les patients (le terme impropre de cystite étant invoqué devant le moindre trouble mictionnel : or, il est des troubles urétraux et des cystalgies sans infection urinaire ainsi que des brûlures vulvo-vaginales).

L'examen cytobactériologique des urines (ECBU), facile à réaliser, permet seul de caractériser l'agent causal et apprécier sa sensibilité aux différents antimicrobiens utilisables. Pour être fiable, il exige cependant que les différentes étapes soient exécutées avec rigueur.

A. Prélèvement

Le recueil correct implique une toilette soigneuse du méat urétral et du prépuce ou du périnée, au savon ou à l'aide d'un antiseptique suivi d'un rinçage. Les urines émises spontanément sont recueillies dans un flacon stérile en cours de miction sur le milieu du jet, « à la volée », appelé deuxième jet après élimination du premier jet qui nettoie au passage l'urètre antérieur. On observera une rétention vésicale d'au moins 4 heures après la précédente miction de manière à ce qu'une éventuelle multiplication bactérienne ait pu se produire in situ. Chez l'homme suspecté de prostatite, on conseille d'étudier également le premier jet, quantitativement plus riche.

Le cathétérisme doit demeurer une pratique d'exception, pratiqué après toilette rigoureuse par un personnel entraîné. Il intéresse une patiente grabataire, comateuse ou en rétention. Chez le nourrisson, après nettoyage soigneux, la poche collectrice stérile ne doit pas rester en place plus de 20 ou 30 minutes, sinon les bactéries présentes dans les canaux des glandes sudoripares refont surface et contaminent l'urine. Il convient donc de renouveler la toilette avant de poser une nouvelle poche.

B. Acheminement au laboratoire et conservation

La conservation des urines avant examen ne doit pas excéder quelques dizaines de minutes à température ordinaire. Ce délai peut être porté à quelques heures en prenant soin de disposer le récipient dans un bain de glace à + 4 °C. Il faut savoir toutefois que cette pratique contrarie l'examen microscopique en favorisant la précipitation des urates, qui obscurcissent la préparation et peuvent masquer la présence d'autres éléments figurés.
Pour stabiliser la croissance bactérienne, on peut aussi user de conservateurs tel un mélange commercialisé comprenant sorbitol, acide borique, fumarate de sodium, autorisant la conservation à température ordinaire.

C. Tests rapides

Il existe des méthodes rapides de dépistage qui peuvent pécher le plus souvent par défaut lorsqu'elles sont utilisées indépendamment les unes des autres (mise en évidence de nitrites reflétant la présence de bactéries, activité estérastique reflétant la présence de leucocytes).
Le dépistage systématique par les bandelettes urinaires de la protéinurie, l'hématurie microscopique, la leucocyturie et la bactériurie, est souhaitable chez les sujets diabétiques, âgés, la femme enceinte et l'insuffisant rénal. La recherche de la bactériurie par le virage de la réaction des nitrates en nitrites témoigne d'une infection à la bactérie Gram négatif type entérobactéries. D'autres bactéries (staphylocoques, entérocoques et *Pseudomonas aeruginosa*) ne produisent pas de nitrates et ne sont donc pas détectables ainsi, seule la leucocyturie oriente alors vers l'infection, et cette positivité doit être contrôlée par un ECBU. Ces tests présentent une bonne valeur prédictive négative.
L'ECBU commence par un examen cytologique et bactériologique au microscope puis la mise en culture et la numération des germes, leur identification et un antibiogramme. Ces résultats doivent être ensuite confrontés aux données cliniques et aux antécédents urologiques et traitements antibiotiques antérieurs.

D. Examen direct : cytologique et bactériologique

Après homogénéisation, les urines sont disposées dans une cellule type Malassez ou Kova® slide, pour examen microscopique. Le nombre des hématies et leucocytes est rendu par mL. Physiologiquement, ce nombre est inférieur à 10 000/mL pour chacun de ces éléments. On apprécie l'importance et la qualité des cellules, des cristaux, des cylindres.

Lors de cet examen, les germes sont facilement discernables. Lorsque la bactériurie dépasse 10^4 UFC/mL, la coloration de Gram ou plus simplement l'observation minutieuse à l'état frais de la préparation en cellule permet déjà le plus souvent à ce stade de suspecter l'infection.

E. En culture

La mise en culture doit répondre à un double objectif : *isolement et numération de l'espèce bactérienne*. Cela peut être réalisé en incorporant ou en étalant à la surface d'un milieu gélosé un faible volume (10 µL) d'urines à l'aide d'une anse calibrée. Il est également possible d'immerger une lame recouverte de milieux gélosés adéquats, le volume retenu étant minime et similaire d'une lame à l'autre ; la densité de la culture est comparée à celle d'abaques.
Le monomicrobisme, du moins en pratique ambulatoire et en l'absence de récurrence, est de règle.
Les milieux retenus seront une gélose « ordinaire » de type trypticase-soja, un milieu pour bacilles à Gram négatif, largement prédominants (Drigalski, éosine-bleu de méthylène ou EBM, cystine lactose électrolyse déficient ou CLED). Si l'on suspecte la présence de bactéries exigeantes, des milieux de culture adaptés devront être utilisés. De nombreux milieux chromogènes (CPS-ID-bioMérieux), révélant la présence d'enzymes bactériens (β-glucuronidase de *Echerichia coli*), permettent isolement, numération et identification rapide en un seul temps grâce à l'aspect coloré des colonies de différentes espèces.
Après 10 à 18 heures à + 37 °C, les colonies apparues sont dénombrées, leur nombre ramené au mL et identifiées. Un antibiogramme sera entrepris simultanément, le choix des molécules testées étant orienté d'après leur pharmacocinétique et la nature suspectée de l'espèce.
La recherche particulière de *Mycobacterium tuberculosis* exige une pratique adaptée qui ne sera pas envisagée ici.

F. Identification et principales espèces responsables

L'identification sera réalisée selon les méthodes classiques ou en s'aidant des procédés automatiques, fournissant un diagnostic en quelques heures (Api, Vitek…).
Les principales espèces rencontrées se répartissent de la manière suivante :

- *en pratique ambulatoire*, *Escherichia coli* prédomine largement (80 à 90 %), du moins lors des premières infections, suivi par *Proteus* (*mirabilis*), *Klebsiella*, entérocoques. À noter l'émergence de *Staphylococcus saprophyticus* affectant plus volontiers les jeunes femmes.
  En cas de récidives, la fréquence des *Klebsiella* et *Proteus* augmente ;
- les patients relevant de chirurgie urologique ou porteurs de sonde à demeure sont particulièrement exposés en outre à des espèces multirésistantes telles que *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, toutes représentatives de l'environnement hospitalier ;
- des espèces exigeantes peuvent, elles aussi, être responsables d'authentiques infections (mycoplasmes, lactobacilles, *Gardnerella*, corynébactérie groupe D2, *Haemophilus*…).

G. Interprétation

L'interprétation détermine la décision thérapeutique ; elle est donc primordiale. Depuis les travaux de Edward H. Kass (1955) on considère qu'une bactériurie supérieure à 10^5 UFC/mL est évocatrice d'infection urinaire, inférieure à 10^4 de souillure. Ces critères ne sont valables que si les procédures de recueil et de traitement des urines ont été scrupuleusement respectées. En outre, il est des circonstances où la fiabilité peut être mise en doute (enfant, sujets indisciplinés n'observant pas un délai minimum de quelques heures entre les mictions). M. Veron, dès 1970, en étudiant une population tout venant, s'oppose à cette théorie bimodale de répartition et fait remarquer que la distribution varie de façon continue selon une loi statistique gaussienne.

Au total, en schématisant, plusieurs situations peuvent être envisagées :

- *cytologie normale, bactériurie < 10^3 UFC/mL* : absence d'infection ;
- *bactériurie franche > 10^5 UFC/mL associée à une leucocyturie pathologique :* l'infection est patente si une ou exceptionnellement 2 bactéries ont été isolées, à partir de 3 bactéries il faut considérer que le recueil de l'urine a été défectueux et refaire l'ECBU (sauf s'il s'agit d'un porteur de sonde urinaire) ;
- *bactériurie franche > 10^5 UFC/mL isolée, leucocytes et hématies sont en nombres normaux*, l'infection est possible néanmoins, un contrôle serait souhaitable en particulier si l'on soupçonne une contamination : par toilette insuffisante (grabataire) ou irréalisable (phimosis : Proteus sp. étant fréquemment en cause chez le garçonnet), par souillure des urines (en cas de leucorrhée, les cellules épithéliales abondent en placard), par mise en culture différée (échantillon transmis sans précaution de conservation). Il est cependant des situations ou l'infection est authentique, sans signe inflammatoire d'accompagnement, ainsi au cours d'une dépression immunitaire (prématuré, chimiothérapie…) ;
- *bactériurie comprise entre 10^3 et 10^5 UFC/mL, leucocyturie pathologique :*
  - chez la femme, en absence de traitement, il peut s'agir d'une infection vésicale débutante. Le germe n'a pu se multiplier suffisamment pour cause de pollakiurie, polyurie. En présence de signes cliniques, un contrôle respectant délai de miction et restriction liquidienne s'impose,
  - prostatite chronique,
  - une antibiothérapie en cours,
  - des espèces dont les caractéristiques rendent la numération aléatoire (*Pseudomonas aeruginosa* agglutinés par leurs flagelles, *Escherichia coli* muqueux…) ;

Bactériurie UFC/ml	Leucocytes/ml	Interprétation
< 10^3	< 10 000	Absence d'infection
> 10^5	> 10 000	Infection
10^3-10^5	> 10 000	Infection possible (infection débutante, prostatite chronique, *Pseudomonas aeruginosa*) Contamination possible *À contrôler*
> 10^5	< 10 000	Contamination probable Infection possible : aplasie *À contrôler*
Absence	> 10 000	Espèces exigeantes

- *leucocyturie pathologique, sans bactériurie associée.* Elle doit faire penser à :
  - espèces présentant des exigences particulières pour croître telles que *Mycobacterium tuberculosis*, lactobacilles, *Escherichia coli* déficient, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella*, anaérobies,
  - obstacle dans les voies excrétrices (tumeur, calcul),
  - bilharziose (à noter l'association fréquente en Afrique avec *Salmonella sp.*).

V. Contribution au choix du traitement

Le clinicien sera guidé par un certain nombre de considérations :
- *bactériologiques* : selon le genre ou l'espèce, la sensibilité naturelle aux différentes classes d'antibactériens varie ;
- *cliniques* : antécédents allergiques, état physiologique (insuffisance rénale, grossesse, âge…).

Le laboratoire proposera pour l'antibiogramme des molécules à concentration urinaire élevée, éliminées par voie rénale sous forme active.
Chez la femme jeune, non enceinte, en cas de premier épisode de cystite, un traitement court monodose peut être proposé (ofloxacine, triméthoprime-sulfamétoxazole, fosfomycine-trométanol).
Pour les autres cas, un traitement d'une durée de 3 jours (quinolones, triméthoprime-sulfamétoxazole) ou de 7 à 10 jours (amoxicilline, nitrofurantoïne), est recommandé.
Devant une pyélonéphrite aiguë, le traitement est entrepris sans délai dès le recueil des urines et le prélèvement d'hémoculture. On a recours habituellement aux céphalosporines de troisième génération (intraveineuses avec relais *per os* par céphalosporines ou fluoroquinolones) ou aux fluoroquinolones (*per os* dans les formes non compliquées chez la femme, intraveineuses dans les formes sévères ou compliquées), pendant 10 ou 15 jours dans les formes sans anomalies urologiques. Selon les schémas, l'addition d'un aminoside est envisagée pour son action synergique bactéricide. Le traitement sera éventuellement corrigé en fonction des résultats de l'antibiogramme. Cette éventualité se produit principalement en milieu hospitalier où les bactéries multirésistantes (*Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*) sont responsables d'infections urinaires nosocomiales.
En ce qui concerne les pyélonéphrites, la surveillance des urines sera assurée 48 heures après le début du traitement et à la fin. L'absence de bactéries cultivables doit être la règle.
Pour des traitements prolongés (prostatite, pyélonéphrite chronique), la surveillance sera mensuelle. Parfois (grossesse), le contrôle itératif est poursuivi (jusqu'à l'accouchement).

Conclusion

Au total, en médecine ambulatoire, la femme est la principale victime des infections urinaires. Le plus souvent d'origine ascendante, l'infection s'installe à la faveur d'un défaut des agents de protection naturelle : diurèse insuffisante, altération de la muqueuse, mauvaise hygiène.

Parfois, on peut incriminer un facteur d'obstruction mécanique (lithiase, tumeur, malformation), métabolique (diabète) ou particulier à la bactérie (adhérence, autres facteurs de virulence). Le laboratoire de biologie intervient à deux stades de l'infection urinaire en concourant au diagnostic et au conseil thérapeutique.

L'essentiel de la question

On distingue classiquement la cystite ou infection urinaire basse et la pyélonéphrite qui affecte le parenchyme rénal. L'infection urinaire est plus fréquente chez la femme pour des raisons anatomiques (urètre court).

L'examen cytobactériologique de l'urine (ECBU) est l'examen bactériologique le plus fréquemment demandé en pratique médicale. Il est fiable et d'interprétation facile. C'est le seul élément de certitude de l'infection du tractus urinaire en appréciant la réaction inflammatoire et en isolant la bactérie responsable. La vessie et l'urine sont des milieux normalement stériles alors que les premiers centimètres de l'urètre sont contaminés par les flores physiologiques de voisinage. Le recueil de l'urine se fait habituellement sur le milieu de jet d'urine après nettoyage soigneux du méat urinaire. Le principal mécanisme de l'infection est la voie ascendante par cheminement urétral pour les infections basses à partir de la flore fécale ou périnéale, ou par reflux vésico-urétéral pour le rein.

Les espèces bactériennes les plus souvent en cause sont représentatives de la flore colique aérobie. En pratique ambulatoire, *Escherichia coli* domine, suivi ensuite par *Proteus, Klebsiella, Staphylococcus saprophyticus* chez la femme jeune, entérocoques. En milieu hospitalier, et notamment chez les porteurs de sonde vésicale, on retrouve en plus des espèces multirésistantes telles que *Enterobacter* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les cystites sont plus fréquentes chez la femme ; chez l'homme adulte, il s'agit souvent d'une prostatite.

Certaines situations sont à risque et favorisent l'infection : la grossesse, le diabète, la personne grabataire. La qualité du recueil de l'urine est essentielle pour la qualité de l'examen. Après le recueil, le transport doit être fait dans un délai court, dans de la glace à + 4 °C.

L'ECBU comprend un examen microscopique afin de déterminer le nombre de leucocytes et d'hématies, la présence de cellules, de cylindres et de bactéries. Le nombre d'hématies et de leucocytes est exprimé par mL et est physiologiquement $< 10^4$/mL. Une mise en culture est réalisée pour isoler et numérer l'espèce bactérienne, l'identifier et réaliser un antibiogramme.

Une bactériurie $> 10^5$UFC/mL est significative d'une infection. L'interprétation d'un ECBU doit être faite en fonction de la leucocyturie, de la bactériurie, de l'espèce en cause et de la connaissance du contexte clinique (sonde urinaire, grossesse, immunodépression).

Pour en savoir plus

- « Examen cytobactériologique des urines (ECBU) » in *Référentiel en microbiologie médicale*, SFM Le Rémic, Montmorency, 2M2, 1998 ; 13-17.
- Conférence de consensus. Antibiothérapie des infections urinaires. *Med Mal Infect* 1991 ; 2 bis.
- Guibert J. Antibiothérapie des infections urinaires : éléments décisionnels et modalité. *Feuillets de biologie* 1994 ; 35 : 9-16.
- Harrewyn L. *et al.* Identification et numération rapide des germes urinaires sur boîte contenant des substrats chromogènes et fluorogènes. *Revue française des laboratoires* 1990 ; 212 : 73-77.

Infections du système nerveux central

A. COLLIGNON
Service de microbiologie, hôpital Jean Verdier, AP-HP, Bondy,
et département de microbiologie, faculté de Pharmacie,
université Paris Sud, Châtenay-Malabry.

Le syndrome méningé a deux origines principales : les méningites proprement dites en général d'origine infectieuse (bactéries, virus, champignons, parasites) et les hémorragies méningées. Nous nous limiterons ici aux méningites d'origine infectieuse. Devant la constatation d'un syndrome méningé chez un patient, une ponction lombaire doit être réalisée dans les plus brefs délais et le liquide céphalo-rachidien (LCR) obtenu doit être analysé en urgence.
Le rôle du laboratoire est primordial car l'examen biologique immédiat du LCR va permettre d'étayer le diagnostic de méningite, de s'orienter vers une étiologie qui pourra être confirmée ultérieurement par la culture et ainsi de participer à la mise en route d'une antibiothérapie efficace.
Après un rappel anatomique, physiopathologique et clinique, nous envisagerons le diagnostic biologique et son interprétation. Enfin nous traiterons du suivi thérapeutique des méningites.

I. Rappel anatomique

Le LCR est contenu dans les cavités des ventricules cérébraux et dans les espaces sous-arachnoïdiens cérébraux et spinaux.
Le LCR est secrété au niveau des ventricules cérébraux par les plexus choroïdes et est réabsorbé par les granulations de Pacchioni. La sécrétion quotidienne chez l'adulte est à l'origine d'un renouvellement trois fois par jour du LCR. Chez l'adulte, le volume normal de LCR est compris entre 100 et 160 mL, chez l'enfant, ce volume est compris entre 10 et 60 mL. Le LCR assure une fonction mécanique de protection du système nerveux contre les chocs et les variations de pression, et une fonction de nutrition et d'épuration par échange constant entre le sang et le tissu nerveux.
Les méninges qui recouvrent le cerveau et la moelle épinière sont constituées de trois feuillets :
- un feuillet méningé externe en rapport avec l'enveloppe osseuse craniorachidienne, la dure-mère ; la dure-mère n'adhère pas au canal osseux rachidien, d'où un espace épidural ;
- un feuillet intermédiaire, l'arachnoïde ;
- un feuillet méningé interne épousant les contours du tissu nerveux, la pie-mère, qui recouvre au niveau cérébral la surface encéphalique et au niveau rachidien le bulbe et la moelle. L'espace sous-arachnoïdien compris entre l'arachnoïde et la pie-mère contient le liquide céphalo-rachidien.

II. Physiopathologie

Le LCR est pauvre en cellules phagocytaires et offre une faible concentration en immunoglobulines et complément. La présence d'un agent infectieux va entraîner une réaction inflammatoire de l'ensemble des formations qui contiennent le LCR.
Les modes d'invasion des méninges sont de deux types : indirect ou direct.
- L'inoculation indirecte correspond aux méningites consécutives à une infection de type septicémique. Ces méningites primitives communautaires sont les plus

fréquentes. À partir d'un foyer infectieux primitif (ORL, pulmonaire…), d'un portage pharyngé, la bactérie envahit le tissu sous-épithélial puis gagne la circulation sanguine. Les bactéries ayant résisté aux divers mécanismes de défense (phagocytose, lyse par les anticorps spécifiques et le complément) peuvent envahir l'espace sous-arachnoïdien et le LCR. La porte d'entrée dans l'espace sous-arachnoïdien correspond à des zones de moindre résistance (plexus choroïdes, capillaires cérébraux…) ;
- L'inoculation directe correspond aux méningites post-traumatiques ou postopératoires où les bactéries sont directement introduites au niveau des lésions (fracture de la base du crâne, brèche de la dure-mère, interventions neurochirurgicales…). Ces méningites dites secondaires peuvent être d'origine nosocomiale. Les espèces retrouvées sont des staphylocoques, des bacilles à Gram négatifs, éventuellement des bactéries anaérobies ; nous ne les traiterons pas ici.

La physiopathologie des méningites bactériennes a été étudiée expérimentalement et est relativement bien connue. L'inflammation des méninges est due à la présence de constituants bactériens tels LPS, acide teichoïque… Ces antigènes bactériens stimulent la production de cytokines qui sont à l'origine de la réaction inflammatoire, avec altération des cellules endothéliales des capillaires cérébraux, modification structurale de la barrière hémato-méningée. Ces modifications entraînent le passage de protéines dans le LCR et la migration des polynucléaires.
Selon l'agent infectieux en cause, bactéries, virus, champignons, les modifications seront plus ou moins importantes.

III. Diagnostic clinique

A. Méningite infectieuse aiguë

De nombreuses espèces bactériennes ainsi que de nombreux virus sont responsables de méningite aiguë.
Le syndrome méningé associe un syndrome infectieux et un syndrome fonctionnel liés à l'inflammation méningée qui entraîne la contracture des muscles paravertébraux dans un but antalgique.
- Le syndrome infectieux se caractérise par une fièvre élevée (40 °C) accompagnée de frissons ;
- Les symptômes fonctionnels se caractérisent par des céphalées pratiquement permanentes, intenses, rebelles aux traitements classiques, accompagnées de photophobie et de rachialgie, de vomissements faciles en « jets ». Les contractures musculaires sont à l'origine d'une raideur de la nuque, d'une attitude du malade en « chien de fusil » et des signes cliniques de Kernig et de Brudzinski.

L'examen clinique pourra mettre en évidence d'autres signes pouvant accompagner le syndrome méningé : diminution du rythme cardiaque, respiratoire, hyperesthésie cutanée, troubles vasomoteurs (raie méningitique de Trousseau), signes neurologiques (convulsions, troubles de la conscience, troubles psychiques).
Chez le nouveau-né et le nourrisson, les signes cliniques sont très différents.

Chez le nouveau-né, les symptômes révélateurs de la méningite néonatale ne sont pas spécifiques de l'atteinte neurologique, ils correspondent à ceux de l'infection néonatale. Chez le nourrisson, la raideur de la nuque est inconstante et souvent remplacée par une hypotonie des muscles du cou. Un bombement de la fontanelle, un plafonnement passager du regard seront des arguments de diagnostic.

B. Méningites infectieuses subaiguës ou chroniques

Certaines bactéries (*Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, etc.), des levures (*Cryptococcus neoformans*, Candida), des parasites, sont responsables de méningites évoluant sur plusieurs semaines. Cliniquement, le syndrome méningé est fruste (céphalée tenace), associé à une fièvre, parfois à un syndrome neurologique.

IV. Diagnostic biologique

A. Le prélèvement

La ponction lombaire, élément exclusif du diagnostic, doit être réalisée en milieu hospitalier devant la constatation d'un syndrome méningé, si possible avant toute antibiothérapie. Elle doit en principe être précédée par un examen du fond d'œil. Le malade est assis, fortement penché en avant ou placé en décubitus latéral. Dans des conditions rigoureuses d'asepsie, le liquide céphalo-rachidien est recueilli au niveau lombaire par ponction dans le cul-de-sac dural entre les espaces intervertébraux L_4-L_5 ou L_5-S_1. Les ponctions sous-occipitales ou intra-ventriculaires sont du ressort du neurochirurgien.
Le LCR (3 à 5 mL le plus souvent) est recueilli dans 3 tubes stériles et immédiatement acheminé au laboratoire, où il sera traité en urgence. Ces précautions tiennent compte de l'urgence de l'examen, de la viabilité des germes (certains, tels *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Hæmophilus influenzae*, sont fragiles et doivent être mis en culture rapidement) et de la lyse cellulaire possible (le LCR est hypotonique et les polynucléaires neutrophiles peuvent se lyser). Le premier tube de prélèvement est en général réservé à l'étude biochimique, les autres à l'étude cytobactériologique. Des volumes de 1 à 2 mL de LCR sont en général suffisants pour détecter les bactéries usuelles mais pour la mise en évidence des mycobactéries et des champignons, des quantités d'au moins 3 mL sont nécessaires. Quand le prélèvement est difficile et qu'un seul tube est obtenu pour l'examen complet, le choix des tests à effectuer en priorité doit être discuté avec le clinicien.

B. Examen macroscopique

Il permet une première orientation diagnostique, tout d'abord au lit du malade puis au laboratoire.

1. LCR normal

Un LCR normal est clair, limpide, eau de roche.

2. LCR pathologique

Un LCR peut être trouble avec différents degrés (dépoli, opalescent, eau de riz) en fonction de la réaction cellulaire, elle-même variable en fonction du type de méningite, bactérienne ou virale.
Un LCR hémorragique signe une origine traumatique ou hémorragique. En cas d'origine traumatique lors de la ponction, il y a présence de sang dans le premier tube et moins ou pas du tout dans les deux autres, et le sang coagule avec un surnageant clair. Dans le cas d'une hémorragie méningée récente, le sang incoagulable est retrouvé dans les trois tubes. Le surnageant est jaunâtre. Dans le cas d'une hémorragie méningée ancienne, le LCR est xanthochromique.
Un LCR ictérique se rencontre en cas de leptospirose, et d'ictère nucléaire néonatal.

C. Examen biochimique

Les dosages biochimiques sont réalisés sur le surnageant après centrifugation.

1. Protéine

Le dosage des protéines du LCR repose sur des méthodes turbidimétriques ou néphélémétriques (acide sulfosalicylique), colorimétriques (technique de Lowry, technique au bleu de Coomassie). La protéinorachie normale chez l'adulte est comprise entre 0,20 et 0,40 g/L. Chez le nouveau-né, une protéinorachie jusqu'à 1,50 g/L est considérée comme normale. La majorité des protéines du LCR ont une origine plasmatique. Toute altération de la barrière hémato-méningée entraînera une augmentation des protéines.
Quand le liquide est sanglant, le dosage sera surestimé par l'apport de protéines plasmatiques.

2. Glucose

La glycorachie doit être interprétée en fonction de la glycémie, en effet elle est fonction de la glycémie par diffusion du glucose plasmatique dans le LCR. Elle correspond à 2/3 de la glycémie et est normalement comprise entre 2,5 et 3,5 mmol/L. La glycorachie est déterminée par des méthodes à la glucose oxydase associées à une réaction colorimétrique (réaction de Trinder) ou à une méthode ampérométrique (électrodes spécifiques).

3. Chlorure

Les ions Cl^- sont concentrés dans le LCR par rapport au plasma, contrairement à tous les autres ions qui sont moins concentrés. La valeur usuelle des chlorures dans le LCR est comprise entre 120 et 130 mmol/L.

4. Acide lactique, lacticodéshydrogénase (LDH)

Dans les méningites bactériennes, la glycolyse en anaérobiose entraîne une accumulation d'acide lactique et une augmentation de l'activité LDH.

D. Examen cytologique

Un LCR normal contient moins de 5 éléments nucléés/mm^3. Un nombre d'hématies jusqu'à 10/mm^3 peut être considéré comme normal. Un LCR normal contient environ 75 % de lymphocytes et 25 % de monocytes. La numération s'élève chez le nouveau-né avec 10 et jusqu'à 20 éléments nucléés. Les variations pathologiques peuvent porter sur les leucocytes, les hématies ou les deux lignées. L'augmentation du nombre d'éléments nucléés varie en fonction de l'étiologie de la méningite.

1. Numération cellulaire

Les éléments nucléés et les hématies sont chiffrés après répartition d'1 ou 2 gouttes de LCR homogénéisé dans une cellule de Nageotte ou de Malassez. Le résultat est exprimé en nombre de cellules par mm^3.

2. Formule leucocytaire

Si le nombre d'éléments nucléés est anormal (> 10/mm^3), on réalise alors une formule de ces éléments. À partir d'un culot de centrifugation (1500 g, 15 min) ou mieux, à l'aide d'une cytocentrifugeuse, on réalise des frottis. L'un sera coloré au May-Grünwald-Giemsa et permettra d'effectuer la formule sur 100 éléments (% de polynucléaires, de lymphocytes, de monocytes, autres…).
Un LCR normal comprend essentiellement des éléments mononucléés (lymphocytes, monocytes), quelques polynucléaires neutrophiles non altérés. En cas de méningite, il y aura afflux de polynucléaires ou de lymphocytes en fonction de l'agent responsable.

E. Examen bactériologique

1. Examen microscopique standard

Coloration de Gram
L'un des frottis réalisé précédemment est coloré par la méthode de Gram. L'utilisation d'une cytocentrifugation permet de concentrer les éléments contenus dans le LCR et augmente de 100 fois la sensibilité de la coloration de Gram. L'examen microscopique à l'objectif à immersion (grossissement 1 000) permettra de rechercher la présence de micro-organismes : cocci à Gram négatifs parfois intracellulaires (méningocoque), cocci à Gram positifs en diplocoques lancéolés (pneumocoque), cocci à Gram positifs en chaînettes (streptocoque B), bacilles à Gram négatifs polymorphes (*Hæmophilus*) ou non (*Escherichia coli*…), bacilles à Gram positifs (*Listeria*), levures (*Cryptococcus neoformans*, Candida).
La coloration de Gram permet de détecter des bactéries au-dessus de 10^5 bactéries par mL de liquide biologique. Entre 70 et 90 % des LCR avec culture positive permettront de visualiser des germes par cette coloration.

2. Examen microscopique orienté

a) Encre de chine

Un examen direct du LCR entre lame et lamelle avec une goutte d'encre de chine diluée permettra la visualisation de la capsule chez l'espèce *Cryptococcus neoformans* (halo réfringent entourant la levure colorée en noir).

b) Coloration de Ziehl-Neelsen ou coloration à l'auramine

En cas de suspicion de méningite tuberculeuse, on recherchera les bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) après coloration d'un frottis par la méthode de Ziehl-Neelsen ou par la méthode à l'auramine. La recherche est difficile et doit être prolongée, en effet, le plus souvent, le prélèvement est paucimicrobien.

c) Microscope à fond noir

Cet examen entre lame et lamelle permettra de visualiser les leptospires.

d) Recherche de parasites

Les trypanosomes, les toxoplasmes, pourront être recherchés sur les culots de centrifugation colorés au May-Grünwald-Giemsa.

3. Recherche d'antigènes solubles

Les antigènes microbiens solubles sont recherchés systématiquement dans le LCR quand l'examen cytobactériologique et/ou la clinique sont en faveur d'une méningite bactérienne ou à levure. Ce sont des exo-antigènes polysaccharidiques originaires de la paroi (streptocoque B) ou de la capsule (pneumocoque, méningocoque A, B, C, Y, W135, *Escherichia coli* K_1, *Hæmophilus influenzae* sérotype b, *Crytococcus neoformans*) libérés dans le milieu biologique. Ces antigènes passent la barrière hémato-méningée, sont éliminés par le rein et peuvent aussi être recherchés dans un deuxième temps dans le sang et l'urine.

Cependant, dans le sang, ces antigènes sont souvent liés aux anticorps et d'autres protéines et les réactions sont négatives ; l'urine, par sa facilité d'obtention et la possibilité de concentration, peut être une alternative intéressante.

Ils sont mis en évidence à l'aide d'anticorps spécifiques par agglutination passive (agglutination de particules de latex sensibilisées par des anticorps spécifiques). La sensibilité des réactions d'agglutination, leur facilité d'emploi, leur rapidité de réalisation, sont à l'origine du développement préférentiel de ces méthodes.

Les réactions d'agglutination se réalisent après chauffage à 100 °C pendant 5 minutes du prélèvement pour éliminer les réactions non spécifiques ; cependant, ce chauffage est contre-indiqué quand l'antigène est thermosensible (méningocoque B, *Escherichia coli* K1).

Un résultat positif permettra de conforter un examen de Gram, de porter rapidement un diagnostic (coloration de Gram ne révélant aucune bactérie), sera capital en cas de méningite décapitée (la culture sera alors négative).

Ces méthodes de détection d'antigènes ne peuvent cependant remplacer l'examen microscopique et la culture qui seront réalisés préférentiellement en cas de prélèvement insuffisant.

Ces premiers résultats obtenus rapidement (examen biochimique, cytologique, bactériologique direct et recherche d'antigènes solubles) sont transmis immédiatement au clinicien afin qu'il adapte le traitement. Ainsi, dans certains cas, une antibiothérapie dirigée remplacera une antibiothérapie à large spectre.

4. Méthodes de détection moléculaire

Les méthodes de biologie moléculaire et plus spécifiquement la PCR apparaissent aujourd'hui d'un grand intérêt pour le diagnostic d'une infection méningée. La PCR classique et la PCR en temps réel sont utilisées.

Des couples d'amorces spécifiques sont définis pour amplifier un gène spécifique d'espèce et de type. Les gènes cibles correspondent le plus souvent à des gènes de virulence.

Ainsi, pour détecter l'espèce *Neisseria meningitidis*, deux couples d'amorces peuvent être utilisés : l'un ciblant une séquence codant l'ARNr 16S, l'autre ciblant le gène *porA* qui code une protéine de membrane externe.

Des amorces ciblant *crgA* qui code un régulateur d'adhésion ou *CtrA* qui code un transporteur capsulaire ont été également utilisées.

Pour déterminer le sérogroupe de *Neisseria meningitidis*, le gène *siaD* intervenant dans la biosynthèse de la capsule a été amplifié et a permis de différencier les sérogroupes B, C, Y, W135 ; pour le sérogroupe A, le gène « *orf-2* » qui code un facteur intervenant dans le transport des composants capsulaires a été amplifié.

Pour identifier l'espèce *Hæmophilus influenzae* les amorces ciblent le gène *bexA* qui intervient dans la synthèse de la capsule.

Pour identifier *Streptococcus pneumoniae*, les amorces utilisées ciblent le gène *ply* qui code la pneumolysine.

5. Culture standard

Chronologiquement, c'est la première chose à réaliser dès l'arrivée du prélèvement au laboratoire. On évite ainsi la disparition des bactéries fragiles et les contaminations éventuelles.

- Les milieux sont sélectionnés pour permettre la culture de toutes les bactéries quelles que soient leurs exigences. En travaillant de façon stérile, on ensemence successivement avec une goutte ou 100 µL de LCR les milieux suivants : une gélose au sang cuit + supplément vitaminique (hémine et NAD), une gélose au sang et un milieu liquide d'enrichissement (bouillon glucosé + extrait globulaire). La gélose au sang cuit est incubée à 37 °C sous 10 % de CO_2 afin de permettre la culture de bactéries nécessitant une atmosphère enrichie en CO_2. La gélose au sang et le milieu d'enrichissement sont incubés en atmosphère normale à 37 °C.
- La lecture s'effectue après 18 ou 24 heures d'incubation, puis quotidiennement pendant 5 jours.
- L'ensemencement quantitatif avec 100 mL de LCR permettra de chiffrer les bactéries par mL de LCR. Un nombre de bactéries ≥ 107 UFC/mL est de mauvais pronostic corrélé avec un taux de mortalité élevé.

6. Culture orientée

En fonction du contexte clinique, des résultats de l'analyse biochimique, de l'examen direct et des antigènes solubles, d'autres milieux pourront être ensemencés.
Si une méningite fongique est suspectée, on ensemencera un milieu de Sabouraud qui sera incubé au minimum 15 jours à 30 °C.
En cas de suspicion d'infection anaérobie, un milieu de Schaedler sera ensemencé après régénération ainsi qu'une gélose au sang ; ces milieux seront incubés en anaérobiose.
En cas de suspicion de méningite tuberculeuse, deux milieux de Löwenstein-Jensen et un milieu de Coletsos seront ensemencés, chacun avec au minimum 3 gouttes de LCR et incubés 3 mois à 37 °C ; un ensemencement avec un inoculum important est nécessaire car le prélèvement est paucibacillaire.
Si une méningite à leptospires est suspectée, on ensemencera des milieux de Stuart enrichis en sérum de lapin.
L'identification en cas de culture positive s'effectue selon les techniques classiques.

7. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

a) Antibiogramme

Si des bactéries sont vues au direct en quantité relativement importante, un antibiogramme est réalisé directement à partir du LCR afin de rendre plus rapidement le résultat de la sensibilité aux antibiotiques.
Les antibiotiques à tester sont choisis en fonction de leur bonne diffusion dans le LCR (passage de la barrière hémato-encéphalique) et de leur activité sur les bactéries responsables de méningites (amoxicilline, céfotaxime, ceftriaxone, chloramphénicol, péfloxacine, cotrimoxazole…). On testera aussi la sensibilité des antibiotiques utilisables par voie intrarachidienne (aminosides) et en prophylaxie (rifampicine, spiramycine…).

b) Recherche de bêtalactamase

Cette recherche est réalisée dès la primoculture pour certaines bactéries (*Hæmophilus influenzae*). La méthode la plus utilisée est la méthode chromogénique utilisant des disques imprégnés d'une céphalosporine chromogène.

c) Détermination des CMI

Pour certaines espèces, la diminution de sensibilité à certains antibiotiques peut être suspectée sur l'antibiogramme par diffusion mais elle nécessite une confirmation par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). C'est le cas du pneumocoque et du méningocoque vis-à-vis des bêtalactamines. Dans ces cas, les CMI de la pénicilline, amoxicilline et céphalosporines de troisième génération (CIIIG) doivent être déterminées.
En pratique courante, la technique E-test est utilisée, la concordance avec la méthode de référence de dilution en milieu solide est bonne. Si, à l'examen direct, on suspecte un pneumocoque ou un méningocoque, si le LCR est relativement riche en germes et si le prélèvement est suffisant, les CMI peuvent être déterminées d'emblée par la technique du E-test ; sinon, les CMI sont déterminées après isolement de la bactérie.

F. Examen virologique

Le diagnostic d'une méningite virale est orienté par les résultats biochimiques et cytologiques et peut être confirmé par la recherche du virus responsable.
La culture, méthode de référence, peut être réalisée après transfert dans de bonnes conditions du prélèvement au laboratoire de virologie. Le LCR est alors inoculé sur culture cellulaire *in vitro*. Le délai de réponse est fonction de la rapidité de culture du virus et de ses effets cytopathogènes.
Des techniques dites de culture rapide se sont développées et permettent de rendre les résultats plus rapidement. Elles associent une centrifugation des prélèvements sur des cellules afin de favoriser les interactions virus-cellule et une détection des virus infectants à l'aide d'anticorps marqués par une enzyme ou un fluorochrome. Cette méthode a été appliquée aux virus HSV-1 et HSV-2, le virus de la varicelle et du zona (VZV) et les entérovirus.
Les méthodes moléculaires d'amplification génique permettent un diagnostic rapide avec une sensibilité égale ou supérieure à celle des cultures cellulaires. Elles sont essentiellement fondées sur la PCR (RT-PCR pour les virus à ARN et PCR pour les virus à ADN).
La PCR est l'examen primordial pour le diagnostic de la méningo-encéphalite herpétique. De même, une RT-PCR ciblant la région 5'NC des entérovirus permet un diagnostic du genre Entérovirus lors des infections neuro-méningées.

G. Examens complémentaires

Des hémocultures seront prélevées après la ponction lombaire, de préférence avant toute antibiothérapie (septicémie associée). Afin de confirmer la porte d'entrée, des prélèvements ORL (oreille, sinus, gorge) pourront être réalisés.
Dans certains cas où la culture est difficile, voire impossible, et nécessite des milieux spéciaux, la recherche d'anticorps spécifiques permettra le diagnostic : méningite à leptospires, à Chlamydia, à *Borrelia*, méningite syphilitique, à virus.
Un dosage d'interféron α augmenté dans les méningites virales sera parfois utile au diagnostic.

V. Interprétation

Le *tableau 1* résume les différents paramètres du LCR normal et pathologique. Il faut noter que les valeurs indiquées dans les différents types de méningites sont les plus fréquemment retrouvées mais peuvent varier dans une fourchette comprise entre 30 et 40 %, d'où une interprétation parfois difficile devant prendre en compte tous les éléments disponibles.
En biologie classiquement, on distingue les méningites purulentes à liquide trouble et les méningites à liquide clair (*tableau 2*).

Tableau 1. Résultats cytologiques et biochimiques du LCR de sujets normaux ou atteints de méningite

Origine Adulte	Aspect du LCR	Étiologie	Cytologie/mm³ type cellulaire	Glucose mmol/L	Protéine g/L	Chlorure mmol/L
Sain	Eau de roche	0	< 5 lymphocytes, monocytes	2,5 à 3,5 2/3 glycémie	0,2 à 0,4	120 à 130
Avec méningite bactérienne	Purulent	Hæmophile Meningo Pneumo Strepto B E. Coli…	> 500 Prédominance de polynucléaires	Diminué	Très augmenté > 1	Normal
Avec méningite bactérienne	Clair à opalescent	Listeria Brucelle Salmonelle	< 500 Panachée	Diminué	Augmenté	Normal
Avec méningite bactérienne	Clair	BK	< 500 Prédominance de lymphocytes	Diminué	Augmenté	Diminué
Avec méningite virale	Clair	Virus	< 500 lymphocytes	Normal	Légèrement augmenté < 1	Normal
Avec méningite fungique	Clair	Cryptococcus, Candida	Augmenté lymphocytes	Diminué	Augmenté	Normal

Tableau 2. Principales espèces bactériennes responsables de méningite communautaire

Méningites purulentes de l'adulte ou de l'enfant	
Espèce responsable	**Caractéristiques**
Streptococcus pneumoniæ : cocci à Gram positif	Responsable d'environ 50 % des cas des méningites bactériennes. En augmentation. Problème des PSDP
Neisseria meningitidis : cocci à Gram négatif	Responsable de la méningite cérébro-spinale (environ 25 % des cas des méningites bactériennes). Gravité du *Purpura fulminans*
Hæmophilus influenzae : bacilles à Gram négatif	Responsable des méningites de l'enfant de moins de 15 ans. En nette diminution depuis la vaccination
Méningites à liquide clair de l'adulte ou de l'enfant	
Espèce responsable	**Caractéristiques**
Mycobacterium tuberculosis : bacilles acido-alcoolo-résistants	Responsable de 1 % des cas des méningites bactériennes. Début progressif
Listeria monocytogenes : bacilles à Gram positif	Responsable de 5 % des cas des méningites bactériennes. Atteinte prédominante du SNC au niveau du tronc cérébral (rhombencéphalite)
Méningites néonatales	
Espèce responsable	**Caractéristiques**
Streptococcus agalactiae (groupe B) : cocci à Gram positif	Responsable de 50 % des méningites néonatales
Escherichia coli K1 : bacilles à Gram négatif	Responsable de 25 % des méningites néonatales
Listeria monocytogenes : bacilles à Gram positif	Responsable de 1 % des méningites néonatales

A. Méningites purulentes

On y observe dans tous les cas le même syndrome biologique : augmentation des éléments nucléés plus ou moins importante, en général > 500/mm^3 avec prédominance de polynucléaires, augmentation des protéines, diminution du glucose (consommé par les bactéries) et chlorures normaux. Le LCR est trouble à partir de 200 ou 300 polynucléaires par mm^3.
Ces méningites sont le plus souvent d'origine bactérienne. Elles sont toujours sévères et mettent en jeu le pronostic vital. Un traitement antibiotique efficace par voie IV doit être instauré dès que la PL a été réalisée.
Une cause rare de méningite purulente est l'amibe *Naegleria fowleri*, qui pénètre dans l'espace sous-arachnoïdien par les fosses nasales à l'occasion d'un bain. Enfin, certaines méningites purulentes sont aseptiques : méningite à éosinophiles, méningites leucémiques, processus expansifs intracrâniens.
Nous limiterons notre exposé aux bactéries les plus fréquemment rencontrées. Toute bactérie isolée du LCR est pathogène sauf en cas de contamination au moment du prélèvement ou de l'ensemencement.

Bactéries responsables de méningites purulentes communautaires de l'enfant et de l'adulte

- *Neisseria meningitidis* ou méningocoque

Le méningocoque est responsable de la méningite cérébro-spinale, maladie à déclaration obligatoire.
Les méningites à méningocoque touchent surtout les enfants jeunes, les adolescents et les adultes jeunes. Une forme gravissime est le *Purpura fulminans* qui augmente significativement le taux de létalité, qui est de l'ordre de 10 %. Cette potentialité d'évolution gravissime justifie que tout purpura fébrile soit dirigé de toute urgence vers un hôpital après injection par voie parentérale à domicile d'une céphalosporine de troisième génération, ou à défaut d'amoxicilline (avis du Conseil supérieur d'hygiène publique de France du 10 mars 2000, *BEH* n° 32/2000).
Ces infections surviennent sur un mode endémique avec quelques poussées épidémiques. En France, le sérogroupe B est prédominant et représente plus de 60 % des cas, suivi du sérogroupe C (environ 25 % des cas) puis très rarement des autres sérogroupes A, Y, W135, etc., lors de circonstances épidémiques particulières.
La transmission du méningocoque est inter-humaine directe par l'intermédiaire des sécrétions oro-pharyngées (proximité inférieure à 1 mètre, durée du contact supérieure à 6 heures) ; en effet, la colonisation s'effectue au niveau du rhino-pharynx et le risque de développer une infection invasive est maximum dans les 8 premiers jours du portage, puis très rare au-delà. Il existe donc un risque pour l'entourage proche du malade, des mesures préventives sont préconisées et ont montré leur utilité : antibioprophylaxie des sujets-contacts par rifampicine (48 heures) ou spiramycine (5 jours) suivie de vaccination si méningocoque A, C, Y ou W135.
Neisseria meningitidis ou méningocoque est un coccus à Gram négatif, en diplocoque souvent intracellulaire. Il cultive à 37 °C sur gélose chocolat enrichie, que l'incubation ait lieu avec ou sans CO_2. Il cultive aussi sur gélose chocolat contenant des inhibiteurs (vancomycine + colimycine) et sur milieu de Mueller-Hinton, qui est recommandé pour faire les agglutinations. Les colonies sont rondes, non pigmentées, brillantes.

L'identification biochimique repose sur les caractères de la famille (oxydase positive) et de l'espèce (attaque du glucose, du maltose, pas d'attaque du fructose, du saccharose et du lactose ; activité gamma-glutamyl-transférase positive).
Le sérogroupage sera réalisé dans un but médical (mise en place d'une prophylaxie spécifique par vaccination pour les méningocoques A, C, Y ou W135) et épidémiologique. Il est fondé sur des différences d'antigénicité des polyosides capsulaires. Il peut être réalisé dans tous les laboratoires pour les sérogroupes les plus fréquents (B, C, A, Y, W135) par une réaction d'agglutination à l'aide d'immunsérums spécifiques. La détermination des sérotypes fondée sur des différences d'immunospécificité de protéines de membrane externe reste du ressort des laboratoires spécialisés tels que le Centre de référence des méningocoques (Institut Pasteur, Paris).
L'antibiogramme permettra de vérifier la sensibilité aux pénicillines, aux céphalosporines de troisième génération et aux antibiotiques utilisables en prophylaxie (rifampicine, spiramycine).
Actuellement, des souches résistantes aux pénicillines, soit par production d'une bêtalactamase, soit par production d'une PLP de faible affinité, ont été décrites. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de déterminer la CMI des bêtalactamines (pénicilline G, amoxicilline, C3G) vis-à-vis des souches de méningocoque ; la technique du E-test est utilisable en pratique courante. Le traitement de première intention repose sur l'utilisation d'une céphalosporine de troisième génération.

• *Streptococcus pneumoniae* ou pneumocoque

Il est devenu l'agent principal des méningites bactériennes en France (47 % des méningites bactériennes tous âges confondus) survenant chez l'adulte et aux âges extrêmes de la vie (enfant < 1 an et vieillard). La mortalité est élevée (entre 20 et 30 %). La porte d'entrée est le plus souvent ORL (otite, sinusite, mastoïdite) ou pulmonaire. Le problème actuel est l'augmentation du nombre de souches de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) qui sont à l'origine de recommandations thérapeutiques spécifiques. L'introduction en France, en janvier 2003, du vaccin antipneumococcique conjugué heptavalent semble responsable d'une diminution du nombre d'infections invasives à pneumocoque chez les enfants de moins de 2 ans, avec une diminution de la fréquence relative des sérotypes inclus dans le vaccin.
Streptococcus pneumoniae est un coque à Gram positif, en diplocoque lancéolé, capsulé, catalase négative (*cf.* Streptococcaceae). Il cultive sur gélose au sang où les colonies présentent une hémolyse de type α (verdissement). L'identification est fondée sur la sensibilité à l'optochine et sur une réaction d'agglutination passive à l'aide de particules de latex sensibilisées par des anticorps spécifiques des 80 sérogroupes capsulaires.
L'antibiogramme devra rechercher une sensibilité diminuée aux bêtalactamines. Les PSDP comprennent des souches à bas niveau de résistance (intermédiaires), et des souches à haut niveau de résistance (résistantes). Cette diminution de sensibilité peut être détectée sur l'antibiogramme par diffusion avec un disque d'oxacilline chargé à 5 µg (diamètre > 25 mm, recommandation du CA-SFM).
Cependant, dans les cas de méningites, il faut d'emblée déterminer les CMI de la pénicilline G, amoxicilline et une céphalosporine de troisième génération (céfotaxime ou ceftriaxone). La technique du E-test est utilisée en pratique courante. Parallèlement à la détermination de la sensibilité des antibiotiques diffusant bien

dans le LCR (bêtalactamines, céphalosporines…), on testera la sensibilité à la vancomycine qui pourra être utilisée en association avec une céphalosporine de troisième génération. En effet, étant donné la forte proportion de PSDP responsable de méningite, le traitement de première intention repose sur l'association d'une céphalosporine de troisième génération à forte posologie (céfotaxime 300 mg/kg/j ou ceftriaxone 100 mg/kg/j) à la vancomycine (60 mg/kg/j). Si les résultats des CMI sont inférieurs à 0,5 mg/L pour les CIIIG, le retour à une posologie habituelle de CIIIG et l'arrêt de la vancomycine sont indiqués.

- *Hæmophilus influenzae* (sérotype b)

Les souches d'*Hæmophilus influenzae* responsables de méningite sont majoritairement les formes capsulées de sérotype b, biotype I. Ce bacille à Gram négatif n'est plus responsable que de 4 % des méningites bactériennes de l'enfant de moins de 15 ans depuis l'apparition de la vaccination dirigée contre *Hæmophilus influenzae* sérotype b (vaccin conjugué PRP-T ; la protéine conjuguée est l'anatoxine tétanique). La vaccination ne semble pas avoir entraîné une augmentation des méningites dues à des souches capsulées d'autres sérotypes, ou non capsulées. La méningite succède le plus souvent à une infection aiguë de la sphère ORL (otite). Avant la vaccination généralisée en France depuis 1993, *Hæmophilus influenzae* sérotype b était responsable de nombreux cas de méningites chez le jeune enfant entre 4 mois et 4 ans. En dehors de cette tranche d'âge, l'absence d'infection s'explique par la présence d'anticorps protecteurs d'origine maternelle avant 3 ou 4 mois, puis après 4 ans par la présence d'anticorps apparus après des infections inapparentes.
Hæmophilus influenzae apparaît souvent polymorphe à la coloration de Gram (formes courtes coccobacillaires et formes longues). C'est une bactérie exigeante ne poussant que sur gélose chocolat enrichie en facteurs de croissance (hémine et NAD), après incubation à 37 °C sous atmosphère enrichie en CO_2. Les colonies sont brillantes, grisâtres, muqueuses (*cf.* capsule). L'identification repose sur l'exigence en facteurs X (hémine) et V (NAD). L'exigence en facteur X peut être remplacée par le test à l'acide delta-aminolévulinique plus facile à interpréter.
Certains caractères biochimiques sont utiles pour définir le biotype (urée, indole, ODC). *Hæmophilus influenzae* peut posséder une capsule polysaccharidique support de la spécificité des 6 sérotypes (a, b, c, d, e, f). Le sérotype sera déterminé par une réaction d'agglutination à l'aide d'anticorps spécifiques. Les souches non capsulées sont non typables. Le polysaccharide de type b est constitué de polyribosyl-ribitol-phosphate ou PRP qui aurait un rôle majeur dans la virulence.
La recherche de bêtalactamase sera impérativement réalisée sur la primoculture, en effet plus de 30 % des souches la secrètent et sont donc résistantes aux aminopénicillines. L'antibiogramme par diffusion sera réalisé sur milieux enrichis tel le milieu HTM (Hæmophilus *Test Medium*). En première intention, le traitement de choix sera l'utilisation de céphalosporines de troisième génération.

B. Méningites à liquide clair

Les étiologies sont nombreuses : virales, tuberculeuses, bactériennes à développement intracellulaire (*Listeria*, *Brucella*, *Salmonella*), bactériennes décapitées, mycosiques, parasitaires. La réaction cellulaire sera en général modérée (< 500 éléments/mm^3).

1. Virales

Ce sont les plus fréquentes des méningites à liquide clair. Tous les virus peuvent être responsables, les plus fréquemment rencontrés sont les Entérovirus (ECHO-virus, Coxsackie), le virus des oreillons (*Paramyxoviridae*), le *Herpes simplex virus*. La chimie du LCR se caractérise par des protéines peu augmentées, le glucose et les chlorures normaux. La cytologie est à prédominance lymphocytaire.
L'évolution est le plus souvent favorable sans traitement dans les cas dus aux Entérovirus ou *Paramyxoviridae*. En cas de méningite ou méningo-encéphalite herpétique, un traitement spécifique doit être instauré par l'acycloguanosine IV (aciclovir) le plus rapidement possible.

2. Bactériennes

a) *Mycobacterium tuberculosis* (BK)

Les méningites tuberculeuses sont rares (1 % des méningites bactériennes). Elles surviennent au moment d'une primo-infection (nourrisson) ou longtemps après lors d'un déficit de l'immunité (sujets âgés, immuno-dépression). La biochimie peut parfois orienter le diagnostic avec des chlorures diminués, des protéines très augmentées, le glucose diminué. La cytologie est à prédominance lymphocytaire.
À côté des cultures classiques sur milieux de Löwenstein-Jensen et Coletsos, qui ne donneront un résultat qu'en 28 jours, on pourra utiliser la culture en milieu liquide sur automate de détection de croissance qui permettra d'obtenir un résultat en une quinzaine de jours :

- système Bactec fondé sur la libération de CO_2 marqué au carbone 14 à partir d'une culture agitée en présence d'acide palmitique marqué ;
- milieu MGIT (*Mycobacterial Growth Indicator Tube*) avec indicateur de fluorescence sensible à la quantité d'oxygène : les mycobactéries présentes dans le milieu, en se développant, réduisent le milieu avec augmentation de la fluorescence.

Parallèlement, les méthodes d'amplification génique peuvent être utiles au diagnostic (amplification des gènes codant pour l'IS6110 ou l'ARNr16S) mais présentent une sensibilité moyenne du fait de la nécessité de diluer le LCR pour éliminer les inhibiteurs de l'amplification.
En cas de suspicion de méningite tuberculeuse, un traitement spécifique antituberculeux doit être instauré dès que les prélèvements ont été réalisés.

b) *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est une bactérie ubiquitaire retrouvée dans le milieu extérieur. Le mode de contamination fait intervenir la voie digestive par l'intermédiaire d'aliments contaminés. Chez l'adulte, la listériose peut évoluer comme une bactériémie isolée ou entraîner une méningo-encéphalite (rhombencéphalite). L'infection est particulièrement grave chez la femme enceinte, pour le fœtus. *Listeria monocytogenes* est responsable d'environ 5 % des méningites bactériennes dans leur ensemble (*BEH* n° 15/1999). La pléiocytose du LCR est modérée avec une formule leucocytaire panachée (moitié polynucléaires, moitié lymphocytes). La protéinorachie est modérément élevée et la glycorachie diminuée.
C'est un bacille à Gram positif qui cultive sur gélose au sang. Les colonies sont petites, translucides, entourées d'une étroite zone d'hémolyse de type bêta plus

visible après 48 heures d'incubation. Les caractères utiles pour l'identification sont : catalase positive, mobilité à 22 °C, attaque rapide de l'esculine.
Listeria monocytogenes est résistante aux céphalosporines de troisième génération. Le traitement des méningites nécessite l'emploi d'une aminopénicilline (amoxicilline) associée à un aminoside, ce dernier n'étant actif que sur les formes circulantes dans le sang.

c) Autres

Certaines bactéries entraînent une réaction cellulaire de type panaché, le nombre d'éléments pouvant être variable. La biochimie se caractérise par des protéines augmentées, un glucose plus ou moins diminué, des chlorures normaux. On peut ainsi citer les *Brucella*, les *Salmonella* où le liquide est clair à opalescent, avec une formule panachée ou lymphocytaire.
Dans la leptospirose, le liquide est ictérique avec une réaction lymphocytaire. Le diagnostic est le plus souvent sérologique.

3. Bactérienne décapitée

En cas de traitement antibiotique préalable et franchissant la barrière hémato-méningée, les bactéries présentes seront incapables de cultiver et la formule leucocytaire pourra être panachée. Il est primordial de pouvoir la différencier d'une méningite virale car un traitement adapté est absolument nécessaire. La recherche des antigènes solubles est ici d'un grand intérêt.

4. Fungique

Elle se rencontre surtout chez les patients immunodéprimés (Sida, thérapeutique immunosuppressive). *Cryptococcus neoformans*, levure capsulée à tropisme méningé, doit être recherchée chez les malades atteints de Sida. De porte d'entrée pulmonaire, les signes cliniques méningés sont parfois frustes. D'autres levures du genre Candida peuvent être responsables de méningites.

5. Parasitaire

La toxoplasmose peut se compliquer de méningo-encéphalite chez les patients atteints de Sida.
En zone d'endémie, la trypanosomiase se caractérise par un taux très élevé d'IgM dans le LCR (synthèse *in situ*). On peut éventuellement mettre en évidence les trypanosomes dans le culot de centrifugation du LCR.

C. Méningites néonatales et bactéries responsables

Ce sont avant tout des septicémies à localisation méningée. La mortalité est lourde.

• *Streptococcus agalactiae* ou streptocoque du groupe B

Cette espèce est responsable de plus de 50 % des cas de méningite néonatale (méningite purulente). C'est un coccus à Gram positif appartenant à la famille des *Streptococcaceae*.

Il cultive sur gélose au sang en donnant des colonies de type streptocoque souvent bêtahémolytique. Son identification est réalisée à l'aide d'anticorps spécifiques du polyoside B de la paroi par une réaction d'agglutination passive.
C'est une espèce qui ne pose pas de problème d'antibiothérapie et qui est le plus souvent traitée par des aminopénicillines (amoxicilline), ou une céphalosporine de troisième génération (céfotaxime, ceftriaxone).

• *Escherichia coli* K_1

Escherichia coli est un bacille à Gram négatif de la famille des Entérobactériacées dont le sérotype capsulaire K1 est responsable de méningites néonatales (25 % des cas, méningite purulente). L'identification repose sur les caractères biochimiques dans un premier temps puis sur la mise en évidence du sérotype capsulaire K1 à l'aide d'anticorps spécifiques par une réaction d'agglutination passive.
Il est intéressant de noter que l'antigène K1 possède la même spécificité antigénique que le polysaccharide capsulaire du méningocoque B.
L'antibiogramme permettra de mettre en évidence la production de pénicillinase, voire de céphalosporinase par la souche. Actuellement, dans la grande majorité des cas, les céphalosporines de troisième génération sont actives.

• *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est responsable d'environ 1 % des méningites néonatales (*BEH* n° 15/1999). La pléiocytose du LCR est modérée avec une formule leucocytaire panachée (moitié polynucléaires, moitié lymphocytes).

VI. Suivi thérapeutique

Une PL de contrôle doit être réalisée entre 24 et 48 heures après le début du traitement d'une méningite purulente. La culture doit être stérile si le traitement a été adéquat. Les éléments diminuent de 90 % entre 3 et 4 jours.
Si l'évolution est favorable, une troisième PL de contrôle pourra être faite juste avant l'arrêt du traitement (après 5 à 10 jours de traitement pour le méningocoque, 7 à 15 jours après l'obtention de l'apyrexie pour les autres bactéries). Les résultats doivent être pratiquement normaux (< 50 éléments/mm^3 ; < 10 % polynucléaires, stérile) pour permettre l'arrêt du traitement.

Conclusion

L'analyse du LCR est l'examen clé de la gestion d'un syndrome méningé. L'analyse biochimique et cytobactériologique du LCR permettra d'affirmer ou d'éliminer le diagnostic de méningite, d'identifier le type de méningite et le cas échéant le microorganisme responsable. En cas de méningite bactérienne, la détermination de la sensibilité aux antibiotiques est indispensable. Ainsi, le rôle du laboratoire est primordial pour diagnostiquer une méningite et suivre l'efficacité du traitement.

L'essentiel de la question

Devant la constatation d'un syndrome méningé chez un patient, une ponction lombaire doit être réalisée dans les plus brefs délais et le liquide céphalo-rachidien (LCR) obtenu doit être analysé en urgence. Le rôle du laboratoire est primordial car l'examen biologique immédiat du LCR va permettre d'étayer le diagnostic de méningite, de s'orienter vers une étiologie qui pourra être confirmée ultérieurement par la culture et ainsi de participer à la mise en route d'une antibiothérapie efficace.
L'examen biologique du LCR comprend :
- un examen macroscopique (liquide clair, opalescent, trouble, hémorragique) ;
- un examen biochimique avec dosage des protéines, de la glycorachie et des chlorures ;
- un examen cytologique avec numération des éléments nucléés et des hématies et formule des éléments nucléés (si le nombre d'éléments > 10/mm^3) après coloration d'un frottis au May-Grünwald-Giemsa ;
- un examen bactériologique avec coloration de Gram sur un frottis pour la recherche de germes visibles, recherche d'antigènes solubles par réaction d'agglutination passive à l'aide d'anticorps spécifiques et mise en culture.

Chronologiquement, la culture est la première chose à réaliser dès l'arrivée du prélèvement au laboratoire. Les milieux sont sélectionnés pour permettre la culture de toutes les bactéries quelles que soient leurs exigences. Si des bactéries sont vues au direct en quantité relativement importante, un antibiogramme est réalisé directement à partir du LCR afin de rendre plus rapidement le résultat de la sensibilité aux antibiotiques.
Après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C, en cas de culture positive, l'identification est réalisée selon des techniques classiques ainsi qu'un antibiogramme. Dans certains cas particuliers, l'antibiogramme est complété par une recherche de bêtalactamases ou la détermination des CMI vis-à-vis des bêtalactamines.
Les méthodes d'amplification géniques offrent l'avantage de donner un résultat rapide avant la culture et de faciliter le diagnostic en cas de méningite décapitée.
Les premiers résultats obtenus rapidement (examen biochimique, cytologique, bactériologique direct et recherche d'antigènes solubles) sont transmis immédiatement au clinicien afin qu'il adapte le traitement. De même, dès qu'une culture est positive, les résultats sont transmis au clinicien ainsi que les résultats de la détermination de la sensibilité aux antibiotiques.
On distingue les méningites purulentes à liquide trouble et les méningites à liquide clair.
- Les méningites purulentes se caractérisent par une augmentation des éléments nucléés en général > 500/mm^3 avec prédominance de polynucléaires, augmentation des protéines, diminution du glucose (consommé par les bactéries) et chlorures normaux.
  Les espèces bactériennes en cause sont le pneumocoque (responsable de 47 % des méningites bactériennes tous âges confondus, survenant chez l'adulte et aux âges extrêmes de la vie), le méningocoque (responsable de la méningite cérébrospinale touchant le jeune enfant, l'adolescent et l'adulte jeune, gravissime par le risque de *Purpura fulminans*) et beaucoup plus rarement depuis la vaccination *Hæmophilus influenzae* sérotype b.

- Les méningites à liquide clair (< 500 éléments/mm^3, formule à prédominance lymphocytaire) sont d'origine virale dans la plupart des cas (Entérovirus, *Paramyxoviridae, Herpes simplex virus*), ou d'origine bactérienne tuberculeuse (1 % des méningites bactériennes), ou encore dues à des bactéries à développement intracellulaire (*Listeria, Brucella, Salmonella*).
  Listeria monocytogenes est responsable d'environ 5 % des méningites bactériennes dans leur ensemble ; la pléiocytose du LCR est modérée avec une formule leucocytaire panachée (moitié polynucléaires, moitié lymphocytes). Enfin, des levures *(Crytococcus neoformans)* et des parasites (toxoplasmes, trypanosomes) peuvent être responsables de méningite à liquide clair.

Chez le nouveau-né, trois espèces sont responsables de méningites néonatales : *Streptococcus agalactiae* ou streptocoque du groupe B, *Escherichia coli* K1 et beaucoup plus rarement *Listeria monocytogenes.*

Les méningites d'origine bactérienne sont toujours sévères et mettent en jeu le pronostic vital. Un traitement antibiotique efficace par voie IV doit être instauré dès que la PL a été réalisée. Une PL de contrôle réalisée entre 24 et 48 heures après le début du traitement doit être stérile si le traitement a été adéquat.

Pour en savoir plus

- Armand-Lefèvre L., Le Thomas I., Moulin F., Gendrel D., Raymond J. *Hæmophilus influenzae* : place dans le portage rhinopharyngé chez l'enfant. *Feuillets de biologie* 2001, 239 : 21-35.
- Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse « Les méningites communautaires ». Saint-Étienne, *Med Mal Infect* 1996, numéro spécial : 944-1124.
- « Examen cytochimique et bactériologique d'un liquide céphalo-rachidien (LCR) » in *SFM, Le Rémic, Référentiel en microbiologie médicale* ; 2M2, Montmorency, 1998 : 49-52.
- Lepoutre A., Georges S., Varon E., Lévy-Bruhl D. *et al.* Évolution de l'incidence des infections invasives à pneumocoques, France 2005 ; *BEH* 2007, 5 : 37-9.
- Parent du Châtelet I., Taha M.-K. Les infections invasives à méningocoque en France en 2005 ; *BEH* 2006, 49 : 383-7.

Les infections sexuellement transmissibles

R. BAURIAUD, J.-C. LEFÈVRE
Laboratoire de bactériologie – hygiène, Institut fédératif de biologie, Toulouse.

I. Les micro-organismes retrouvés dans les infections génitales avec écoulements

- **A.** *Neisseria gonorrhœae*
- **B.** *Chlamydia trachomatis*
- **C.** La vaginose bactérienne
- **D.** *Gardnerella vaginalis*
- **E.** Les mycoplasmes génitaux
- **F.** *Candida albicans*
- **G.** *Trichomonas vaginalis*

II. Les micro-organismes retrouvés dans les infections génitales avec chancres et ulcérations

- **A.** *Treponema pallidum*
- **B.** *Haemophilus ducreyi*
- **C.** Le lymphogranulome vénérien ou maladie de Durand-Nicolas-Favre
- **D.** La donovanose (*Calymmatobacterium granulomatis*)
- **E.** *Herpes simplex* virus 2

III. Tumeurs virales bénignes

- **A.** Les condylomes acuminés
- **B.** *Le molluscum contagiosum*

L'augmentation du nombre des infections sexuellement transmissibles (IST) a été notée dans le monde entier durant le dernier quart du xxe siècle, particulièrement dans les pays industrialisés chez le jeune, la femme et l'homosexuel masculin. De nombreux facteurs interviennent dans ce phénomène, notamment la modification des comportements sexuels et l'usage des contraceptifs. Les agents des infections classiques, comme la gonococcie, la syphilis, n'ont pas été éradiqués malgré les connaissances acquises et si des progrès ont été faits dans la découverte du rôle de nouveaux organismes comme le Chlamydia ou le virus du Sida, de nombreux éléments concernant leur physiopathologie ou leur traitement restent encore à élucider.

L'apparition de l'épidémie due au virus du Sida dans les années quatre-vingt et les méthodes de prévention ont permis de faire diminuer le nombre d'IST dans un premier temps mais, dès 1998, on a assisté à une première hausse des infections à gonocoque en France, suivie fin 2000 du retour spectaculaire de la syphilis. Même constat à San Francisco, Sidney et les pays européens en général où cette augmentation des IST est suivie en 2001 d'un accroissement du nombre de personnes infectées par le VIH.

Cela est probablement dû à la multiplication des comportements sexuels à risque, dès lors que les traitements antirétroviraux fortement actifs ont été mis sur le marché en 1996, et peut-être encore davantage aux améliorations virologiques et immunologiques qui résultent de la prise de tels traitements (augmentation des lymphocytes CD4, chute de la charge virale en dessous du seuil de détection).

Certaines études indiquent que les changements de comportement liés à l'apparition de nouveaux traitements sont particulièrement nets chez les séropositifs.

Il reste à préciser les reculs de la prévention susceptibles de se produire dans d'autres groupes, chez les usagers de drogue en particulier.

Il a été montré, plus récemment, que les épisodes d'IST aiguës favorisent la transmission du VIH et qu'ils étaient associés à une augmentation de la charge virale sanguine.

D'autres agents infectieux dont la transmission n'est pas uniquement sexuelle ont vu leur fréquence de transmission sexuelle augmenter, c'est le cas en particulier du virus de l'hépatite.

Le grand nombre de formes cliniques asymptomatiques ou atypiques entraîne des complications ayant des conséquences sur la santé de la mère et de l'enfant. Elles font de ces infections, avec leur fréquence accrue, un problème de santé publique. Ainsi, une étude prospective du service public de santé américain prévoit que si la progression des IST se poursuit au rythme actuel, en l'an 2000, 15 % des femmes seront hospitalisées pour salpingite et 10 % seront stériles.

L'OMS estime à 250 millions par an au moins le nombre de IST dans le monde. Ce chiffre se décompose en 120 millions de trichomonases, 50 millions de chlamydiases, 30 millions de verrues génitales, 25 millions de gonococcies, 20 millions d'herpès génital, 3,5 millions de syphilis et 2 millions de chancre mou. Les IST bactériennes constituent en outre un facteur de potentialisation du Sida en matière de fréquence de contamination et de gravité. D'abord cantonné aux infections avec ulcérations, on peut maintenant étendre le phénomène à celles avec écoulement.

Certains micro-organismes, bactéries, parasites ou virus d'origine exogène ont une transmission sexuelle exclusive. Il s'agit de Treponema pallidum (agent de la syphilis), de Neisseria gonorrhœae, de Chlamydia trachomatis et de Trichomonas vaginalis. D'autres ont une transmission sexuelle prédominante comme Haemophilus ducreyi et Herpes simplex virus 2. Enfin, d'autres peuvent être transmis par voie sexuelle au cours d'infections qui ont dans la majorité des cas une origine endogène. Il s'agit de la vaginose bactérienne où se multiplient Gardnerella vaginalis, les anaérobies et les mycoplasmes génitaux, ainsi que la vulvo-vaginite à Candida.

On peut classer ces différents agents selon qu'ils sont retrouvés dans les écoulements ou dans les chancres et ulcérations génitales. Enfin, il faut mentionner les tumeurs virales bénignes.

I. Les micro-organismes retrouvés dans les infections génitales avec écoulements

A. *Neisseria gonorrhœae*

1. Historique

Décrit par Albert Neisser en 1879, le gonocoque, dans un pus urétral et oculaire, est connu depuis la plus haute antiquité. La gonococcie, bien que d'évolution différente, a longtemps été confondue avec la syphilis. La différence a été montrée par Hernandez en 1812.
Le traitement va connaître de nombreuses étapes. En 1936, on fait la preuve de l'efficacité des sulfamides, et en 1943 la pénicilline prend le relais. L'isolement de souches productrices de bêtalactamases en 1976 a changé les données du problème, le traitement par la pénicilline étant le plus utilisé dans le monde. En 1986, des souches résistances à la tétracycline ont aussi été isolées aux USA.

2. Épidémiologie

Infection bénigne si le diagnostic et le traitement sont précoces, la gonococcie s'avère grave en cas de non-traitement, pouvant entraîner des complications redoutables : salpingite, épididymite et stérilité. Avec l'émergence du Sida, on assiste dans les pays industrialisés à une diminution du nombre de gonococcies. En France, le nombre de souches isolées est en diminution constante avec 867 isolats en 1986 contre 169 en 1996.
L'incidence de la maladie est maximale dans les pays en voie de développement où des études sur les femmes enceintes ont montré une prévalence de 10 % en Afrique, 5 % en Amérique latine et 4 % en Asie.
Neisseria gonorrhœae est une bactérie exigeante et très fragile, parasite strict de l'homme, la transmission se faisant directement par contact sexuel.
Les femmes porteuses de stérilet courent un risque plus grand de complications à type de salpingite aiguë.

3. Pouvoir pathogène

a) Manifestations cliniques

• Chez l'homme
L'urétrite aiguë est l'infection la plus commune chez l'homme.
La période d'incubation peut aller de 1 à 14 jours, mais elle est en général de 2 à 5 jours. Elle est impossible à préciser dans 20 % des cas. Il s'agit essentiellement d'une urétrite aiguë avec un prurit au niveau du méat, un écoulement plus ou moins important et purulent, parfois blanchâtre, parfois jaunâtre. Les brûlures à la miction sont en général intenses. En dehors de la forme aiguë, le malade peut d'emblée présenter une urétrite subaiguë (2 % des cas) ou plus rarement une pyurie. Des complications

peuvent apparaître souvent dans les formes asymptomatiques (10 %) ou chez les malades qui attendent un long délai avant de consulter. Il s'agit notamment d'épididymite, de prostatite, d'atteinte des canaux éjaculateurs et des vésicules séminales.

• Chez la femme

L'incubation est difficile à préciser dans 80 % des cas. Des rapports récents prouvent que 60 % à 80 % des femmes ayant un gonocoque seraient asymptomatiques contre 10 % seulement des hommes.

Exceptionnellement, l'infection prend un caractère aigu. Le symptôme le plus commun est l'infection du tractus génital bas, avec leucorrhée, dysurie, métrorragie. En général, il s'agit d'une urétrite discrète, avec dysurie, sensation de chaleur ou de brûlure à la miction, d'une cervicite ou d'une métrite. Des complications surviennent dans un nombre important de cas : abcès de la glande de Bartholin et essentiellement salpingites.

Chez la femme enceinte, les symptômes sont les mêmes mais peuvent aboutir à un avortement spontané, une rupture prématurée des membranes, un accouchement prématuré ou une chorioamniotite aiguë.

• Chez l'enfant

Chez le nouveau-né, on peut voir une infection ophtalmique ou pharyngée et chez la petite fille des vulvo-vaginites.

b) Localisation ano-rectale

Elle apparaît, soit par inoculation directe chez l'homosexuel, soit par autocontamination chez la femme, en cas de leucorrhées importantes. On la trouve dans 5 % des cas chez la femme, mais dans 40 % des cas chez l'homme homosexuel. Elle est le plus souvent asymptomatique.

c) Localisation pharyngée

Elle est essentiellement fonction de la fréquence des rapports oro-génitaux. Elle est cliniquement asymptomatique dans 80 % des cas.

Ces deux localisations sont en augmentation constante en Europe et aux USA. Elles incitent à faire des prélèvements systématiques au niveau anal et pharyngé.

d) Autres manifestations

La diffusion septicémique est à l'origine de diverses localisations extragénitales : cutanées, et surtout articulaires (dans 60 à 80 % des cas, il s'agit d'une polyarthrite). La périhépatite, ou syndrome de Fitz Hugh et Curtis, est une péritonite aiguë, localisée dans l'hypocondre droit, qui peut être d'origine gonococcique.

4. Physiopathologie

La progression de la maladie peut s'expliquer par la difficulté de rompre la chaîne épidémiologique mais aussi par sa physiopathologie particulière et certaines propriétés de *Neisseria gonorrhœae*.

La paroi est composée d'une couche de peptidoglycane recouverte d'une membrane externe constituée de phospholipides, de lipopolysaccharides et de protéines dont certaines, très étudiées, ont un rôle probable dans le pouvoir pathogène, mais encore mal précisé.

D'autre part, on sait que les pili jouent un rôle primordial dans la fixation des gonocoques aux cellules hôtes et donc dans la virulence de la bactérie. Utilisés pour des essais vaccinaux, ils n'ont pas prouvé leur efficacité.
Le complément constitue un moyen de défense non spécifique : on a observé des infections gonococciques généralisées sur des patients déficitaires en composants C6, C7 et C8.

5. Diagnostic bactériologique

a) Prélèvement

Il peut se faire à l'aide d'anse plastique à usage unique type Bactopick, ou à l'aide d'un écouvillon. Les cotons pouvant, lors de la stérilisation, libérer des substances toxiques pour les bactéries, on doit utiliser des écouvillons traités par le charbon ou l'alginate de calcium.

- Chez l'homme, le prélèvement est effectué au niveau du méat ou à l'extrémité de l'urètre antérieur. Dans les formes asymptomatiques, il est utile de prélever la sécrétion urétroprostatique après un massage prudent de la prostate ;
- Chez la femme, le prélèvement se fait au niveau de l'orifice externe du col en laissant l'écouvillon quelques secondes au niveau de l'urètre et éventuellement, au niveau des glandes de Bartholin.

Chez l'homme comme chez la femme, un prélèvement systématique réalisé au niveau du pharynx et du rectum est préconisé par certains.
L'ensemencement immédiat du prélèvement sur milieux appropriés donne les meilleurs résultats. Si ce n'est pas possible, on peut utiliser des milieux de transport, le repiquage devant être fait entre 6 et 24 heures, ou utiliser des milieux permettant à la fois le transport et la culture.

b) Examen direct

L'examen microscopique direct est fondamental chez l'homme puisqu'il permet un diagnostic dans 90 % des cas. En revanche, chez la femme, il n'est positif que dans moins de 50 % des cas ; il montre la présence de diplocoques en grain de café à Gram négatif, à l'intérieur ou à l'extérieur des polynucléaires.

c) Culture – Identification

La première est difficile à réaliser. Le gonocoque ne pousse jamais sur milieux ordinaires. Les milieux doivent contenir du sang, du plasma, du sérum ou de l'hémoglobine, qui ont un effet détoxifiant sur certaines substances contenues dans les géloses. Des suppléments doivent être ajoutés en raison des besoins en facteurs de croissance. Dans les prélèvements polymicrobiens, des antibiotiques sont ajoutés : vancomycine, colistine, amphotéricine, triméthoprime (mélange de Thayer et Martin). Ces milieux doivent être préchauffés à l'étuve avant d'être ensemencés. Une fois ensemencés, ils sont mis à 35 °C ou 36 °C sous une atmosphère enrichie au CO_2 de 8 à 10 % maximum. Les colonies apparaissent en général en 24 ou 48 heures, elles ont 0,5 µm de diamètre, arrondies, régulièrement convexes, légèrement visqueuses. Kellog, en 1971, a distingué 4 types morphologiques différents de colonies T1, T2, T3 et T4. Seules les colonies de types 1 et 2 (bactéries avec pili) sont virulentes chez l'homme (80 à 90 % des colonies à l'isolement étant de type 1).

L'identification est basée sur la présence d'un cytochrome oxydase et sur l'étude du métabolisme sucré : le glucose est dégradé mais non le maltose, le saccharose et le lévulose.

d) Méthode de biologie moléculaire

Des techniques pour amplification génique utilisant le *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sont commercialisées (Amplicor Roche).

e) Sensibilité aux antibiotiques

L'apparition de souches résistantes aux bêtalactamines, aux tétracyclines, et maintenant aux quinolones (Asie, Pacifique, côte Ouest des Etats-Unis), impose une surveillance de l'antibiogramme.
Pour le traitement, le CDC d'Atlanta recommande l'usage des céphalosporines de troisième génération ou les quinolones (la spectinomycine peut être utilisée en cas de résistance à ces molécules).

f) Diagnostic indirect

La blennorragie est une maladie peu immunisante : les anticorps circulants n'apparaissent que tardivement.
De nombreuses techniques ont été proposées : réaction de fixation du complément, immunofluorescence indirecte et hémagglutination indirecte. Elles ont peu d'intérêt actuellement car elles manquent de sensibilité et de spécificité.

B. *Chlamydia trachomatis*

1. Historique

Des inclusions à l'intérieur de cellules conjonctivales trachomateuses sont observées pour la première fois en 1907 par Halberstaedter et von Prowazek.
Lindner, dès 1909, trouve des inclusions identiques dans les cellules épithéliales, urétrales, de trois hommes ayant une urétrite subaiguë amicrobienne.
Chlamydia trachomatis est isolé pour la première fois chez un malade atteint de lymphogranulomatose vénérienne. Le premier isolement du tractus génital fut fait par John Collier et Smith en 1959, à partir du col d'une mère d'un enfant présentant une ophtalmie néonatale. Chez l'homme, il est isolé en 1964, dans l'urètre, associé à des cas de conjonctivites.
Les cultures de tissus pour isolement des *Chlamydias* sont effectuées par Gordon en 1963.

2. Épidémiologie

La fréquence des infections à *Chlamydia trachomatis* apparaît supérieure à celles des infections gonococciques dans les pays développés. Selon les dernières enquêtes épidémiologiques, l'urétrite à *Chlamydia* représente 40 à 60 % des urétrites non-gonococciques (UNG). Aux USA, on considère à ce jour que 4 millions de sujets sont infectés chaque année par *Chlamydia* et le nombre serait plus élevé chez

la femme que chez l'homme. Actuellement, *Chlamydia trachomatis* est responsable de 60 à 80 % des salpingites observées dans les pays industrialisés.
Chlamydia trachomatis est isolée moins fréquemment chez les homosexuels que chez les hétérosexuels. D'autre part, des études ont montré sa présence chez 70 % de malades présentant une urétrite postgonococcique. Ces deux micro-organismes pouvant exister simultanément suggèrent que l'homme peut s'infecter à la fois par le gonocoque, et par *Chlamydia trachomatis*, mais qu'il développe les symptômes séparément en raison de durées d'incubation différentes.

3. Cycle de développement des Chlamydias

Ce sont des micro-organismes au développement intracellulaire obligatoire. Longtemps rapprochés du virus, il est bien établi maintenant que ce sont des bactéries puisque possédant les 2 types d'acide nucléique.
Elles effectuent un cycle complexe de développement à l'intérieur de la cellule hôte : la particule infectieuse pénètre par phagocytose : c'est une bactérie sphérique de petite taille, 300 à 500 µm, appelée corps élémentaire, qui subit des modifications de structure conduisant à un élément sphérique de 800 µm, le corps initial ou corps réticulé, cela entre 12 et 24 heures.
Ce corps réticulé se divise par divisions binaires. La vacuole intracytoplasmique renferme plusieurs corps réticulés : c'est l'inclusion qui est une véritable microcolonie. Entre 36 et 48 heures, les corps élémentaires apparaissent au sein de la population des corps réticulés. Le mécanisme de cette transformation n'est pas encore connu. L'inclusion augmentant, il y a éclatement de la cellule-hôte. C'est le corps élémentaire qui représente l'élément infectieux.

4. Pouvoir pathogène

La transmission par voie sexuelle a été démontrée. L'incubation est variable, mais les symptômes apparaîtraient en moyenne trois semaines après le contact sexuel avec un partenaire infecté.

a) Chez l'homme

• Urétrite
Elle est généralement subaiguë dans 50 % des cas environ. On constate parfois une goutte matinale isolée, des brûlures ou des douleurs urétrales sans écoulement. Dans moins de 5 % des cas, il s'agit d'une urétrite aiguë. Les signes urinaires du type brûlure à la miction sont constatés dans la moitié des cas. L'épididymite est une complication associée à l'urétrite chez les malades de moins de 35 ans en activité sexuelle.

• Prostatite
Son rôle dans cette affection n'est pas encore établi.

• Syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter
Associant une atteinte urétrale, articulaire et oculaire, il serait sous la dépendance de deux facteurs, bactérien et génétique. La présence de l'antigène HLA B27 augmenterait de 10 fois le risque d'acquérir un syndrome de Reiter. *Chlamydia trachomatis* est impliqué comme facteur bactérien.
L'arthrite réactionnelle isolée à *Chlamydia trachomatis* est fréquente.

b) Chez la femme

L'infection à *Chlamydia trachomatis* est très souvent asymptomatique. La majorité des femmes présentent une dysurie intermittente. La plupart sont traitées car ayant eu un contact avec un homme présentant une urétrite à *Chlamydia*.

• Cervicite
L'endocol est le site de multiplication électif de *Chlamydia* chez la femme : la cervicite chlamydienne est une endocervicite. Le jeune âge, le nombre de grossesses, l'utilisation de contraceptif oral sont les facteurs intervenant dans l'acquisition des infections à *Chlamydia*. L'infection à *Chlamydia* paraît être la plus commune chez la femme présentant une ectopie cervicale, qui pourrait être entraînée par l'utilisation de la pilule.

• Salpingite
Elle est la conséquence majeure de la pauvreté et/ou de l'absence des signes cliniques qui conduisent les femmes à ignorer ou à minimiser leurs symptômes. *Chlamydia* est isolé pour la première fois par Eilard en 1976, puis par Mardh et Henry Suchet dans des salpingites. La salpingite apparaît généralement chez la femme jeune et semble dépendante du nombre d'infections. Les formes silencieuses sont des causes de stérilité fréquentes (60 % de stérilité tubaire).
La salpingite aiguë est associée à des métrorragies dans 20 à 40 % des cas. Il paraît exister une corrélation entre l'augmentation du taux des anticorps et la gravité des lésions. La périhépatite, ou syndrome de Fitz Hugh et Curtis, serait davantage commune après ou avec une salpingite à *Chlamydia* que celle survenant après l'infection à gonocoque. *Chlamydia trachomatis* peut être la cause d'endométrite, infection probablement précurseur de la salpingite.

• Bartholinite
Comme le gonocoque, *Chlamydia trachomatis* peut produire une infection exsudative des glandes de Bartholin.

• Fièvre du *post-partum*
Il y aurait une relation étroite entre la présence de *Mycoplasma hominis* et de *Chlamydia trachomatis* dans la fièvre du *post-partum*.

c) Chez l'enfant

En 1977, des auteurs ont identifié *Chlamydia trachomatis* comme agent de pneumopathies chez le nouveau-né aux USA. Dans 50 % des cas, elles sont accompagnées de conjonctivites. La contamination se fait lors du passage du fœtus dans les voies génitales de la mère, au moment de l'accouchement.

5. Diagnostic

Il repose sur la mise en évidence de la bactérie ou de ses antigènes par examen direct et/ou culture, et sur la recherche des anticorps sériques.

a) Prélèvement

Il se fait chez la femme au niveau de l'endocol ou de l'urètre, chez l'homme à 3 ou 4 cm de profondeur. *Chlamydia trachomatis* ayant un développement intracellulaire, il est indispensable que le prélèvement comporte des cellules. On peut utiliser

des curettes ophtalmiques, un écouvillon classique fin en coton, ou en plastique type Bactopick.
Après avoir réalisé des lames pour examen direct, le prélèvement est ensemencé directement en culture de cellules ou placé dans un milieu de transport (milieu 2 SP = solution tampon phosphate avec saccharose et antibiotique). Le transport doit être rapide et se faire dans la glace. À l'arrivée au laboratoire, le prélèvement peut être congelé à – 70 °C ou être ensemencé directement.
Les technologies de biologie moléculaire utilisées montrent des résultats identiques lorsque les prélèvements sont réalisés en laboratoire, ou par le patient lui-même (autoprélèvement). Celui-ci s'effectue par recueil à l'entrée du vagin chez la femme, ou par recueil du premier jet d'urine chez l'homme.
Ces techniques peuvent également être utilisées pour la recherche de gonocoque.

b) Examen direct

Cet examen n'est que rarement utilisé (la technique employée est celle d'immunofluorescence directe).

c) Culture

Rarement effectuées, sauf en contrôle de traitement, les méthodes de biologie moléculaire n'étaient pas utiles dans ces cas.
La culture se fait par des inoculations de cultures cellulaires. Les cellules utilisées sont en général des cellules Mac Coy en présence de cycloheximide inhibiteur de la réplication cellulaire.
Après 48 heures ou 72 heures d'incubation à 36 °C sous CO_2, les inclusions sont mises en évidence par une technique d'immunofluorescence directe : il s'agit d'inclusions intracytoplasmiques.

d) Méthodes de biologie moléculaire

Ce sont les méthodes les plus utilisées. Des sondes permettant la détection de l'ARN ribosomique (ARN) de *Chlamydia trachomatis* sont commercialisées (système Gen Probe Pace). Leur utilisation est simple, mais leur apport dans la sensibilité de la détection est encore limité.
Plus intéressantes sont les techniques d'amplification génique utilisant la *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Elles permettent d'amplifier, soit un plasmide spécifique de *Chlamydia trachomatis*, soit le gène omp1 codant pour la protéine majeure de membrane externe, soit un gène codant pour l'ARN2.
Un système semi-automatisé Amplicor Roche permet une détection en 4 heures. La détection est très spécifique et beaucoup plus sensible que les autres techniques. Ce système reste encore coûteux.

e) Sérodiagnostic

Tout bilan de recherche de Chlamydia doit comporter une sérologie qui est d'un intérêt tout particulier pour les infections profondes ainsi que pour les infections chroniques cicatricielles pour lesquelles les techniques de PCR peuvent être négatives.
Les techniques utilisées sont l'Elisa, l'immunofluorescence indirecte ou la réaction de fixation du complément.

L'immunofluorescence indirecte est la plus spécifique et la plus sensible. Cette technique permet de détecter des titres d'anticorps bas. La détection d'IgM positive prouve en général une première infection récente.
Les taux d'anticorps sont plus élevés en cas d'infection profonde (plus élevés chez l'homme avec une épididymite que chez celui présentant une urétrite, et de même plus élevés chez la femme avec une salpingite que chez une femme avec une cervicite non compliquée). L'arrivée d'une nouvelle espèce, *Chlamydia pneumoniae* (agent de pneumopathies atypiques) a permis une amélioration de la spécificité du sérodiagnostic par l'utilisation d'antigènes d'espèce à la place d'antigènes de groupe utilisés auparavant.

6. Sensibilité aux antibiotiques

In vitro, *Chlamydia trachomatis* est sensible aux tétracyclines, aux macrolides, aux quinolones, à la rifampicine et résistante aux aminosides.
Le traitement utilisé est l'azithromycine en simple dose, ou la doxycycline pendant 7 jours. Cependant, les effets indésirables de ces 2 types de molécules sont à l'origine d'une mauvaise compliance qui pourrait expliquer des échecs thérapeutiques. La durée du traitement qui utilise essentiellement les tétracyclines, les macrolides, est variable. Elle varie de 7 à 21 jours pour les infections banales, plusieurs mois pour les infections profondes.
On peut également utiliser les quinolones (ofloxacine), dont l'efficacité est identique à celle des cyclines, mais ils sont plus chers et ne donnent pas d'avantage pour la durée du traitement.
Le patient doit s'abstenir de tout rapport sexuel pendant le traitement et également jusqu'à ce que ses partenaires soient traités.

C. La vaginose bactérienne

1. Introduction

La vaginose bactérienne constitue une des causes les plus fréquentes de leucorrhées chez la femme en période d'activité génitale. Elle est en effet diagnostiquée chez 15 à 40 % des patientes consultant pour une leucorrhée, et chez 15 à 25 % de femmes enceintes.
Elle est la condition préexistante à la survenue d'une salpingite due à des anaérobies ou à des mycoplasmes. Le lien entre la vaginose bactérienne et la prématurité est maintenant clairement établi. Les traitements antibiotiques n'ont pas diminué significativement ce risque sans doute parce qu'ils étaient administrés trop tardivement au cours de la grossesse et par voie vaginale. Le dépistage précoce de la vaginose bactérienne pourrait donc réduire ce risque.
La vaginose bactérienne résulte d'une modification de la flore vaginale avec le remplacement des *Lactobacillus sp.* par une association de *Gardnerella vaginalis*, d'espèces d'anaérobies diverses : *Bacteroïdes sp*, *Prevotella sp*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus sp*, *Mobiluncus sp*, *Eubacterium sp*, *Fusobacterium sp*, *Veillonella sp*, et de *Mycoplasma hominis*.

Les causes de la multiplication anormale de ces micro-organismes de la flore endogène ne sont pas toutes connues. Il existe vraisemblablement des facteurs liés à l'hôte, notamment hormonaux mais aussi bactériens. En effet, certains *Lactobacillus* sont affectés plus que d'autres par le processus de substitution. Pour certains auteurs l'étape préalable à l'apparition d'une vaginose bactérienne serait la disparition des *Lactobacillus* producteurs de peroxyde d'hydrogène (substances toxiques pour les *Gardnerella vaginalis* et pour les espèces anaérobies). La vaginose bactérienne pourrait dans certains cas seulement être d'origine exogène.
Une bactérie anaérobie résistante au métronidazole, *Atopobium vaginae*, a été retrouvée par technique PCR chez 70 % des femmes présentant une vaginose bactérienne. Contrairement aux autres anaérobies, celle-ci n'est pas une composante de la flore vaginale normale.

2. Diagnostic

a) Bioclinique

La vaginose bactérienne est définie selon l'OMS par une leucorrhée vaginale et l'absence à l'examen microscopique de levures et de trichomonas, et par la présence de deux ou plus des critères suivants :
- pH vaginal supérieur ou égal à 4,5 ;
- mise en évidence d'une odeur de poisson lorsqu'une goutte de prélèvement est mélangée à une goutte de potasse à 10 % sur une lame ;
- présence de cellules indicatrices ou *clue-cells* à l'examen microscopique, c'est-à-dire cellules vaginales épithéliales bourrées de coccobacilles.

b) Au laboratoire

On accorde une grande importance à l'aspect du frottis vaginal fixé et coloré par la méthode de Gram qui donne un aspect caractéristique de la flore obtenue. En pratique, on attribue un score à chaque frottis en fonction du morphotype et du nombre de bactéries observées.
La culture au laboratoire met en évidence le marqueur le plus fréquent qui est *Gardnerella vaginalis*.

D. Gardnerella vaginalis

1. Historique

Léopold, en 1953, isole chez des femmes présentant une vaginite et chez des hommes atteints de prostatite, avec ou sans urétrite, un bacille à Gram négatif, qu'il classe dans le genre *Haemophilus*. En 1955, Gardner et Dukes donnent le nom d'*Haemophilus vaginalis* à un bacille Gram négatif retrouvé dans les prélèvements vaginaux de 93 % des femmes présentant une vaginose bactérienne (syndrome caractérisé par un écoulement vaginal malodorant sans signe inflammatoire).
Appelé ensuite *Corynebacterium vaginale*, il a été transféré dans le genre *Gardnerella* en 1980 par Greenwood et Pickett.

2. Diagnostic

a) Culture

Elle se fait sur gélose Columbia au sang humain à 5 % avec mélange inhibiteur, acide nalidixique-colimycine, mis à incuber à 37 °C en présence de 5 % de CO_2. Les colonies qui apparaissent entre 24 et 48 heures sont rondes, opaques et bêta-hémolytiques.

b) Identification

Elle repose sur la mise en évidence de coccobacilles à Gram négatif, catalase négative, oxydase négative, dont la croissance est inhibée par 50 µg de métronidazole et 5 µg de triméthoprime mais non par 1 mg de sulfamides.
Piot a décrit 8 biotypes en étudiant les caractères suivants : hydrolyse de l'hippurate, recherche de lipase, présence de bêtagalactosidase.

3. Sensibilité aux antibiotiques

Les souches sont sensibles aux pénicillines, vancomycine, érythromycine, clindamycine et métronidazole ; la moitié est résistante aux tétracyclines.
Le métronidazole est le médicament le plus efficace dans le traitement : 400 à 500 mg 2 fois/jour pendant 7 jours. Il semblerait efficace à court terme mais pas à long terme, ce qui suppose un traitement visant à rétablir l'écologie de la flore vaginale.
L'ampicilline ou la clindamycine sont utilisées chez la femme enceinte.
En dépit de leur efficacité *in vitro*, la tétracycline et l'érythromycine sont inactives dans la plupart des cas.
Il n'y a pas, pour le moment, nécessité d'un traitement du partenaire de la femme infectée, sauf si celui-ci présente des signes cliniques.

E. Les mycoplasmes génitaux

1. Historique

En 1937, Dienes et Edsall rapportent l'isolement d'un mycoplasme d'un abcès de la glande de Bartholin chez une femme.

2. Colonisation

Ce sont les plus petits micro-organismes vivant à l'état libre, dotés de pouvoir de synthèse et capables de cultiver sur des milieux inertes. La taille moyenne est de 130 nm. Ils ne possèdent pas de paroi, ce qui les rend totalement insensibles aux bêtalactamines.
Ils appartiennent à la classe des *Mollicutes* comprenant l'ordre des *Mycoplasmatales*, la famille des *Mycoplasmataceae* et les genres *Mycoplasma* et *Ureaplasma*, qui ont tous les deux besoin de cholestérol pour être cultivés.

Pour *Mycoplasma hominis*, on connaît 3 sous-types sérologiques et pour *Ureaplasma urealyticum*, 14.
Les mycoplasmes génitaux *Ureaplasma urealyticum (séparés maintenant en deux espèces Ureaplasma parvum et Ureaplasma urealyticum), Mycoplasma hominis* et une nouvelle espèce décrite récemment *Mycoplasma genitalium* sont relativement faciles à mettre en évidence à partir de prélèvements génitaux.
En revanche, l'interprétation de leur présence est plus délicate. En effet, ils peuvent être présents à l'état de commensal au niveau du tractus génital.
Des études sont actuellement en cours qui préciseront peut-être l'implication de certains biovars des *Ureaplasma* dans les IST.
Le nourrisson peut être contaminé au moment de l'accouchement. La contamination néonatale ne persiste pas. Après la puberté, la colonisation augmente, en rapport avec l'activité sexuelle. Elle augmente plus vite chez la femme que chez l'homme, suggérant que la femme est plus sensible à cet organisme. Les taux d'anticorps croissent avec l'âge, avec un pic entre 40 et 49 ans. Il y a une corrélation entre le taux d'isolement et l'activité sexuelle, le taux d'isolement étant plus élevé chez les partenaires d'hommes ou de femmes infectés. L'utilisation régulière de préservatifs retarde la colonisation de l'urètre chez l'homme.

3. Pouvoir pathogène

a) Urétrite

Les dernières études suggèrent que *Ureaplasma urealyticum* est responsable de 10 à 20 % d'urétrites non-gonococciques et *Mycoplasma hominis* pourrait être responsable de prostatites chroniques. Bien que le premier mycoplasme d'origine humaine ait été isolé dans un abcès de la glande de Bartholin, il n'apparaît pas maintenant qu'il soit en cause dans cette affection.

b) Vaginose bactérienne

Des études rapportent que le taux d'isolement de *Mycoplasma hominis* chez des femmes présentant une vaginose est deux fois plus élevé que chez des femmes saines. Il semblerait qu'il joue un rôle dans la vaginose bactérienne en association avec *Gardnerella vaginalis* et les anaérobies.
Ureaplasma urealyticum, en revanche, est isolé autant chez la femme présentant une infection génitale basse que chez la femme asymptomatique.

c) Infections pelviennes aiguës

Mycoplasma hominis est la cause de 5 % de salpingites. Dans les fièvres du *post-abortum*, il a été retrouvé dans le sang des patientes. Chez 50 % des femmes ayant eu des avortements fébriles, des anticorps sont retrouvés. *Mycoplasma hominis* peut également être une cause de fièvre du *post-partum*.

d) Calculs urinaires

La présence d'une uréase chez *Ureaplasma urealyticum* jouerait un rôle dans la survenue de lithiase urinaire phospho-ammoniaco-magnésienne.

e) Stérilité

Fowlks et ses collaborateurs, en étudiant le sperme contenant des *Ureaplasma*, constatent que les spermatozoïdes ont une mobilité diminuée et qu'ils présentent des formes aberrantes. Cependant, son rôle exact dans les stérilités masculines reste à définir, d'autres études ne montrant pas de différence dans les échantillons de sujets stériles ou non stériles contenant des *Ureaplasma*.

f) Autres affections

Ureaplasma urealyticum a été mis en cause dans des avortements spontanés à répétition, des prématurés, des hypotrophies néonatales ou des chorioamniotites.
Mycoplasma genitalium a été isolé à partir d'urétrites non-gonococciques. Il a des propriétés d'adhérence qui en font un mycoplasme potentiellement pathogène et il interviendrait dans les salpingites.

4. Diagnostic

a) Prélèvements

Les prélèvements des sécrétions génitales peuvent se faire à l'aide d'un écouvillon en plastique de type Bactopick. On peut également les rechercher dans l'urine après centrifugation et concentration, dans le sperme, les liquides d'épanchement, les prélèvements ano-rectaux ou pharyngés.

b) Culture

Elle nécessite des milieux contenant du cholestérol ; il est amené sous forme de sérum de veau ou de poulain à la concentration de 10 à 20 %.

- Pour *Ureaplasma*, milieux solides ou liquides, on utilise le milieu de Shepard à pH 6 qui contient de la trypticase soja 2,4 %, du sérum de poulain 20 %, de l'extrait de levure 0,5 %, de la cystéine 0,01 %, de l'urée 0,04 %, rouge de phénol 0,002 %, de la pénicilline à 1 000 unités/mL ;
- Pour les mycoplasmes, on utilise le milieu de Hayflick modifié à pH 7,2. Il contient de l'Heart Infusion Broth 1,75 M, du sérum de poulain 20 %, de l'extrait de levure 2,5 %, DNA 0,002 %, de l'arginine 1 %, du rouge de phénol 0,002 %, de la pénicilline 1 000 unités/mL et de l'acétate de thallium 0,7 %.

Après ensemencement en nappe, les cultures sont mises à incuber sous CO_2, à 10 %.

c) Identification

Elle repose sur la morphologie des colonies et sur le virage des milieux liquides.

- Les colonies d'*Ureaplasma* sont de très petite taille, visibles à la loupe. Celles de *Mycoplasma* sont caractéristiques, en œuf sur le plat ;
- Le virage des milieux liquides, dû à une alcalinisation du milieu, indique pour *Mycoplasma hominis* l'hydrolyse de l'arginine, et pour *Ureaplasma urealyticum* celle de l'urée.

Des tests d'inhibition métabolique sont utilisés pour déterminer le sérotype d'une souche isolée.

- *Mycoplasma genitalium* : de plus en plus recherché car pouvant être responsable de cervicite, d'endométrie, de salpingite chez la femme. Sa culture est très difficile. Le diagnostic se fait par méthode de biologie moléculaire (PCR) ;
- Le sérodiagnostic n'est plus réalisé.

5. Sensibilité aux antibiotiques

On décrit des souches d'*Ureaplasma* et de *Mycoplasma hominis* résistantes à la tétracycline. Parmi les macrolides, *Mycoplasma hominis* est naturellement résistant à l'érythromycine. En revanche, des molécules plus récentes comme la josamycine sont actives sur les deux espèces.
Pour le traitement, les tétracyclines et les macrolides sont les deux familles les plus efficaces. On vérifie leur efficacité par une culture de contrôle 8 à 10 jours après l'arrêt du traitement.

F. Candida albicans

1. Introduction

Les candidoses sont des affections dues à des levures du genre *Candida*. Ce genre rassemble plus de 100 espèces, une dizaine rencontrée en pathologie humaine, la plus fréquente étant *Candida albicans*. D'autres levures peuvent être isolées dans les prélèvements génitaux, notamment *Candidas glabrata*, habituellement saprophyte du tube digestif, peut devenir pathogène s'il prolifère.
La contamination peut se faire par contact direct au cours de rapports sexuels, mais il est des circonstances favorisant son développement : traitement par les antibiotiques, les corticoïdes, les immunodépresseurs, les hormones sexuelles, le diabète, la grossesse, l'insuffisance thyroïdienne ou des facteurs locaux.
La candidose vaginale s'inscrit dans le cadre des infections transmissibles par voie sexuelle par sa prévalence durant la période d'activité sexuelle, la transmission (rare) au partenaire et la grande fréquence dans les populations fréquentant les consultations de vénérologie.
La fréquence de vulvo-vaginite à Candida chez la femme est de 75 % aux USA. Entre 40 et 50 % de ces femmes ont présenté un nouvel épisode et 5 à 8 % une infection chronique à Candida.
La prévalence des vulvo-vaginites à Candida augmente en raison d'un nombre croissant d'espèces « non-*albicans* » impliquées (10 à 20 %), et pour lesquelles les thérapeutiques habituelles peuvent ne pas être actives.

2. Pouvoir pathogène

a) Chez l'homme

Il s'agit parfois d'une urétrite le plus souvent subaiguë. La période d'incubation est impossible à préciser. Une balanite et une balanoposthite sont associées à l'urétrite dans 50 % des cas.

b) Chez la femme

Il s'agit d'une vulvo-vaginite avec prurit vulvaire, brûlure vaginale, leucorrhées abondantes blanchâtres crémeuses, parfois cervicite et exocervicite, atteinte des glandes de Skene et de Bartholin. La recherche d'autres localisations est indispensable, orteils, mains, cuisses.
Chez la femme enceinte, Candida peut infecter l'enfant lors de l'accouchement.

3. Diagnostic

a) Examen direct

Il permet de mettre en évidence des levures et des filaments mycéliens.

b) Culture

Elle est indispensable pour confirmer le diagnostic. Les levures se multiplient bien sûr des milieux de culture à température ambiante et à 37 °C, gélose au sang, gélose chocolat ou milieu simple type Sabouraud.
Les colonies se développent entre 24 et 48 heures.

c) Identification

L'identification présomptive de l'espèce *Candida albicans* peut être réalisée très rapidement en cherchant la filamentation sur sérum humain des colonies isolées par des tests d'agglutination, ou en utilisant des milieux chromogènes.
Pour les autres espèces, des tests morphologiques et une galerie d'identification sont nécessaires.
La recherche d'anticorps n'est valable que dans les mycoses systémiques, septicémies, atteintes viscérales profondes.

4. Sensibilité aux antifongiques

Elle ne doit pas être réalisée en routine.
L'antifongigramme est justifié dans le cas de candidose récidivante pour mettre en évidence une éventuelle diminution de la sensibilité de la souche, en particulier *Candida glabrata* vis-à-vis des azolés.
Les candidoses génitales seraient pratiquement toujours associées à une candidose digestive d'où la possibilité d'un traitement général. On donne cependant la priorité au traitement local. La candidose urétrogénitale pouvant être transmise par voie sexuelle, il est souhaitable de traiter le partenaire.
Des conseils d'hygiène sont utiles à suivre. Il faut :
- supprimer les savons acides et changer fréquemment de sous-vêtements ;
- assécher la peau après la toilette ;
- rétablir l'équilibre digestif par l'alimentation, régime riche en protéines.

La thérapeutique est parfois décevante.
Traitement recommandé :
Court, d'une simple application locale à un traitement de 2 à 3 jours, par des azolés essentiellement :
- butoconazole ;

- cotrimazole ;
- miconazole ;
- tioconazole ;
- terconazole.

En cas de candidose récidivante, le traitement local est de 7 à 14 jours et peut s'accompagner d'un traitement par voie orale (fluconazole).

G. *Trichomonas vaginalis*

1. Historique

Alfred Donne, dès 1836, décrit des animalcules observés dans les produits de sécrétions d'organes génitaux de l'homme et de la femme.

2. Épidémiologie

La transmission se fait essentiellement lors de rapports sexuels par les formes végétatives.

En effet, l'organisme est retrouvé chez 30 à 40 % des partenaires mâles des femmes infectées, et chez la femme chez 85 % des partenaires d'hommes infectés. On le retrouve davantage chez les malades ayant un haut niveau d'activité sexuelle et un grand nombre de partenaires sexuels différents.

La répartition par tranche d'âge montre une nette prédominance chez les femmes de 21 à 25 ans ; très rare chez l'enfant. Il existe une possibilité de contamination par le linge et les objets de toilette, les sièges et l'eau des WC. L'organisme, très sensible à la dessiccation, pourrait survivre 90 minutes dans une éponge humide (il n'existe pas de forme kystique).

3. Pouvoir pathogène

a) Chez l'homme

Il s'agit d'une urétrite subaiguë en général. Les formes asymptomatiques sont de plus en plus fréquentes, 20 à 30 % des cas. Les complications sont : prostatite classiquement fréquente, épididymite, orchiépididymite, balanite, balanoposthite.

b) Chez la femme

La période d'incubation est souvent impossible à préciser, de 4 jours à 4 semaines dans 60 % des cas. L'infection se traduit par une vulvo-vaginite subaiguë avec leucorrhées plus ou moins abondantes, mousseuses et aérées, parfois jaunâtres, parfois blanchâtres.

Il existe des formes asymptomatiques dans 15 à 20 % des cas.

Il existe d'autres formes cliniques à type de douleurs pelviennes, des formes hémorragiques, métrorragies.

Complications : atteinte des glandes de Skene et de Bartholin, pyosalpinx, infection du cordon et du placenta de femmes infectées. On a décrit des cas de salpingites. Chez la femme enceinte, il peut y avoir des ruptures prématurées des membranes.

c) Chez l'enfant

On le retrouve chez à peu près 5 % des bébés-filles de mères infectées.

4. Diagnostic

Ce sont des micro-organismes flagellés, eucaryotes, de 7 à 23 microns de long sur 5 à 12 microns de large. Ils seraient susceptibles de phagocyter des bactéries. On les décrit comme anaérobies, cependant, une faible concentration d'oxygène est nécessaire à leur développement.
On peut les mettre en évidence dans les sécrétions urétrogénitales, mais aussi dans le culot de centrifugation urinaire, les sécrétions prostatiques ou le sperme.

a) L'examen direct

Entre lame et lamelle, il montre des parasites très mobiles. Une goutte de sécrétion prélevée au niveau de l'urètre, du vagin ou du col, mélangée à une goutte de sérum physiologique ou de milieu de Hanks à 37 °C est examinée au microscope à fond noir ordinaire, ou à contraste de phase. Les colorations de May Grünwald Giemsa ou à l'acridine orange donnent de bons résultats.

b) La culture

Elle est particulièrement intéressante chez la femme ; *Trichomonas vaginalis* est un anaérobie préférentiel qui se multiplie entre 24 et 48 heures. Il n'existe pas de sérologie.

5. Traitement

Trichomonas vaginalis est sensible au métronidazole :
- soit 2 g oral en simple dose ;
- soit en l'absence de réponse 500 mg 2 fois/jour pendant 7 jours.

II. Les micro-organismes retrouvés dans les infections génitales avec chancres et ulcérations

A. *Treponema pallidum*

1. Historique

Treponema pallidum ou tréponème pâle, découvert par Schaudinn et Hoffmann en 1905, est l'agent de la syphilis. Le terme fut créé par le poète et épidémiologiste Fracastor en 1530. L'origine de la syphilis est controversée en Europe, pour les uns, apparue après la découverte de l'Amérique par Christophe Colomb (1492), existant bien avant son voyage pour les autres.
Le tableau clinique n'est décrit qu'à la fin du XIXe siècle. Il faut attendre le XXe siècle pour que des progrès soient réalisés, tant sur le plan diagnostique que thérapeutique.

C'est la découverte du tréponème, en 1905, qui permet de préciser l'autonomie de la syphilis, confondue jusqu'alors avec la blennorragie ou le chancre mou. En 1906, Wasserman, Neisser et Bruck appliquent au sérodiagnostic la réaction de fixation du complément décrite par Bordet et Gengou l'année précédente.
Les premiers essais thérapeutiques étaient à base de sels de mercure, puis de dérivés d'arsenic et de bismuth. En 1942, la pénicilline ouvre une voie nouvelle dans le traitement et entraîne une réduction des cas de syphilis par son action tréponémicide.

2. Épidémiologie

La contamination est le fait de contacts ou de rapports sexuels. Mais il faut citer une exception importante, la contamination par voie transplacentaire de la mère à l'enfant, responsable de la syphilis congénitale.

3. Pouvoir pathogène

■ *Aspect clinique*

On peut distinguer différentes étapes dans la syphilis :

• Primaire

La lésion primaire est typique, c'est le chancre, mais elle peut passer inaperçue (chez la femme en particulier). L'incubation est de 10 à 90 jours (en moyenne 3 semaines). Il s'agit d'une lésion unique mais elle peut être multiple, associée à une adénopathie régionale, le chancre est indolore. Des lésions primaires peuvent apparaître dans des sites extragénitaux. Sans traitement, ces lésions disparaissent en quelques semaines.

• Secondaire

Après quelques semaines ou quelques mois, ou coïncidant avec les lésions primaires, une maladie systémique peut se développer, caractérisée par une fébricule, des malaises, une asthénie, des maux de tête, des adénopathies, un subictère, des douleurs ostéo-articulaires. Elles correspondent à une importante dissémination tréponémique par voie sanguine ou lymphatique.

- *Les manifestations cutanées* et *muqueuses* sont variées, appartenant en général à la catégorie des lésions papulosquameuses ;
- *L'alopécie* survient entre le 3e et le 6e mois : elle guérit en général entre 2 et 3 semaines.

• Tertiaire

Cette phase apparaît 5 à 10 jours après l'accident primaire, mais parfois 15, 20 ou 30 ans plus tard. Elle apparaît chez 10 à 20 % des sujets. Les lésions sont destructives mais peu ou pas contagieuses et relèvent de phénomènes d'hypersensibilité retardée. On peut voir :

- des manifestations cutanéo-muqueuses ;
- des complications cardio-vasculaires et neurologiques ;
- l'anévrisme de l'aorte, surtout de l'aorte thoracique ;
- la neurosyphilis, présentant des manifestations diverses avec paralysie générale, les foyers encéphaliques fourmillent de tréponèmes ;
- le tabès correspond à une réaction auto-immune ; on ne trouve pas de tréponème dans les lésions.

• Syphilis latente
C'est une période cliniquement silencieuse qui suit la phase primo-secondaire. Beaucoup d'affections peuvent passer totalement inaperçues et n'être découvertes qu'au cours d'un examen sérologique systématique.

• Syphilis congénitale
Le nombre de cas a considérablement diminué en Europe, mais elle existe toujours dans certains pays. La notion selon laquelle le tréponème ne pourrait franchir le placenta avant le 4e mois de la grossesse est remise en question.
Le tréponème a été retrouvé dans des fœtus de moins de 18 semaines. L'infection peut se manifester dès la naissance ou plus tardivement. Elle peut provoquer toutes les manifestations de la syphilis acquise de l'adulte. Acquise vers le 5e mois de grossesse, elle peut provoquer la mort du fœtus par atteinte polyviscérale ou des malformations.

• Syphilis chez les sujets séropositifs pour le VIH
La syphilis acquise par un sujet préalablement séropositif pour le VIH semble différente de la syphilis du sujet immunocompétent. On note des modifications dans la transmission, la clinique et la réponse biologique.

4. Diagnostic

La bactérie responsable est *Treponema pallidum*. Les tréponèmes sont des bactéries sporulées, mobiles, du genre *Treponema* et de la famille des *Spirochetaceae*. Contrairement à la plupart des espèces saprophytes des muqueuses, les tréponèmes pathogènes pour l'homme ne sont pas cultivables *in vitro* ; ce sont des bactéries strictement humaines responsables de la syphilis et des tréponématoses endémiques, à transmission non sexuelle.
À la différence de *Treponema pallidum subspecies pallidum* responsable de la syphilis, *Treponema pallidum subspecies pertenue*, agent du pian, *Treponema pallidum subspecies endemicum* agent du bejel et *Treponema carateum*, agent de la pinta ou carate sont responsables de lésions cutanées transmises dès l'enfance, par contage direct.
Ces tréponèmes pathogènes présentent une très grande homologie de leur génome, ce qui explique l'impossibilité de les distinguer par les moyens diagnostiques actuels, tant directs qu'indirects.
Le tréponème pâle ne peut pas être cultivé *in vitro*. Le diagnostic bactériologique repose sur :
- la mise en évidence de la bactérie à l'examen direct ;
- les réactions sérologiques.

a) Mise en évidence de la bactérie

• Prélèvement
On l'effectue sur les lésions cutanéo-muqueuses au cours des stades primaire et secondaire de la maladie. La technique doit être rigoureuse et aucune pommade antibiotique ni autre forme de traitement ne doivent avoir été appliquées durant les 2 ou 3 jours précédant l'examen.
Après nettoyage à l'eau physiologique de la surface de la lésion, la sérosité de raclage est prélevée avec un vaccinostyle, déposée sur une lame et immédiatement examinée au microscope. En cas d'application d'antibiotiques locaux, on peut aussi examiner le matériel obtenu par ponction de ganglions lymphatiques.

• Examen direct
L'examen du prélèvement au microscope à fond noir constitue le procédé de choix pour mettre en évidence *Treponema pallidum*, reconnaissable par sa morphologie hélicoïdale et sa mobilité caractéristique. Une confusion est toutefois possible, en particulier au cours de l'examen des lésions orales, avec les spirochètes saprophytes de la cavité buccale. C'est pour cette raison que les procédés de coloration, comme la coloration argentique de Fontana-Tribondeau, préconisés autrefois, sont aujourd'hui abandonnés : ils déforment le tréponème.
En revanche, la coloration par immunofluorescence directe permet un diagnostic précis, mais elle est difficile à réaliser et ne remet pas en évidence la mobilité particulière de la bactérie.
En pratique, la recherche directe du tréponème pâle se fera essentiellement ou niveau du chancre, des adénopathies, des plaques muqueuses et des syphilides cutanées.
Positive, elle revêt une grande importance car elle permet la mise en œuvre immédiate d'un traitement pénicilliné.
Négative, elle ne permet pas d'exclure le diagnostic de syphilis qui doit alors être exploré par des méthodes sérologiques.

b) Diagnostic sérologique

• Réactions utilisant un antigène non tréponémique : réactions cardiolipidiques.
Elles permettent la détection d'anticorps non spécifiques, les réagines.
Le cardiolipide est un haptène lipidique présent dans le tréponème pâle mais aussi dans les autres tréponèmes saprophytes et pathogènes, et dans d'autres cellules animales et végétales. Cette ubiquité explique la spécificité insuffisante des réactions cardiolipidiques, à l'origine de résultats faussement positifs.
Ces fausses positivités sont transitoires ou durables et s'observent dans des circonstances très variées : infections (lèpre, tuberculose, leptospirose, borréliose, virose), grossesse, toxicomanie IV, affections diverses (cyrrhose, lupus, Hodgkin).
Les réactions du VDRL (mises au point par le *Venereal Disease Research Laboratory Test*) et du VDRL charbon (comme le RPR – *Rapid Plasma Reagin Test*) sont des réactions d'agglutination passive qui peuvent donner des réactions faussement négatives par phénomène de zone.
Elles ont l'avantage d'être de réalisation simple, rapide et de faible coût. Après titrage, les réagines sont utiles pour la surveillance sérologique après traitement.
Enfin, leur mise en évidence dans le LCR est un élément diagnostic important en faveur d'une neurosyphilis. Le résultat qualitatif est exprimé en croix selon la taille de l'agglutination (0 à +++). Le titre d'anticorps correspond à l'inverse de la dilution du sérum, donnant encore une réaction positive.
• Réactions utilisant un antigène tréponémique spécifique.
L'antigène utilisé provient de tréponèmes pâles d'origine humaine qui ont été adaptés et entretenus sur testicules de lapin (souches Nichols).

Utilisation de tréponème pâle vivant : test de Nelson

En présence de complément, certains anticorps, les immobilisines, sont capables de tuer et, ainsi, d'immobiliser les tréponèmes pâles. Leur recherche constitue une réaction dotée d'une spécificité quasi absolue qui, pour cette raison, doit garder la valeur de test de référence. Mais sa complexité en fait réserver la réalisation à des laboratoires spécialisés.

Utilisation du tréponème pâle tué

- FTA abs test (*Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test*).
  C'est une application de la technique d'immunofluorescence. Pour éliminer les réactions faussement positives, les sérums sont préalablement absorbés par un ultrasonat de tréponèmes saprophytes qui va fixer les anticorps non spécifiques dans leur grande majorité. Le FTA abs constitue aujourd'hui une réaction essentielle dans le diagnostic de la syphilis en raison de sa grande spécificité et de son excellente sensibilité. Il nécessite cependant un appareillage particulier et n'est pas applicable aux grandes séries ;
- TPHA (*Treponema Pallidum Haemagglutination Assay*).
  Il s'agit d'une application de l'hémagglutination passive au sérodiagnostic de la syphilis. Là encore, le sérum est préalablement traité pour éliminer les anticorps non spécifiques. Le réel avantage du TPHA réside dans le fait qu'il allie la spécificité et la sensibilité des tests tréponémiques à la simplicité des réactions cardiolipidiques. Les réactions positives, à tort très rares, peuvent se voir au cours de maladies auto-immunes.
  Son intérêt est beaucoup plus limité dans la surveillance de l'efficacité du traitement.
  Les résultats sont donnés en croix (0 à 4+) selon le degré d'hémagglutination, le dépistage s'effectuant avec une dilution initiale du sérum au 1/80e.

Méthodes immunoenzimatiques de type Elisa

Elles utilisent des antigènes d'origine variable : protéines recombinantes ou lysat de tréponèmes pâles. Comme le FTA abs, elles permettent la détection d'anticorps totaux ou appartenant aux classes IgG ou IgM.
Elles présentent l'avantage d'une lecture objective, sont de réalisation simple et parfaitement adaptées à l'étude de grandes séries. Uniquement qualitatives pour l'heure, elles impliquent en cas de résultat positif lors du dépistage le recours à un autre test tréponémique pour le titrage des anticorps.

Le test d'immunotransfert ou western-blot

La caractérisation d'antigènes immunodominants, séparés par électrophorèse, d'un lysat de tréponèmes pâles, est une méthode prometteuse pour confirmer de façon très spécifique une infection syphilitique et, chez le nouveau-né, pour rechercher les IgM.
Mais il s'agit de tests très coûteux dont l'interprétation est difficile et pour ces raisons, non utilisés en pratique courante.

c) Recherche d'IgM antitréponémiques

Ce sont les premiers anticorps qui apparaissent lors d'une primo-infection syphilitique. Leur présence ayant aussi été révélée au cours des différents stades de la maladie, leur détection est d'un grand intérêt dans le dépistage précoce, le diagnostic de la syphilis congénitale et pour apprécier l'évolutivité de la maladie.
Différentes techniques peuvent être utilisées :

- immunofluorescences : dans le FTA abs IgM, l'antiglobuline polyvalente utilisée dans le FTA abs test est remplacée par une antiglobuline monospécifique anti

IgM. La possibilité de réactions faussement positives (facteur rhumatoïde, autres autoanticorps) et faussement négatives (inhibition compétitive due à un excès d'IgG) lui a fait préférer le FTA abs IgM 19S dans lequel une séparation des immunoglobulines sériques est réalisée au préalable ;
- hémagglutination passive : SPHA (*Solid Phase Hemaglutination Assay*) après immunocapture des IgM sériques sur plaque ;
- méthode immunoenzymatique avec immunocapture des EgM (Captia Syphilis M) sensible et spécifique, mais dont le coût en limite l'utilisation ;
- l'interprétation des résultats, toujours délicate, doit tenir compte de la possibilité de résultats positifs à tort, en particulier avec le FTA abs IgM, et de l'absence fréquente d'IgM aux stades tardifs de l'infection et au cours des réinfections.

d) Cinétique des anticorps

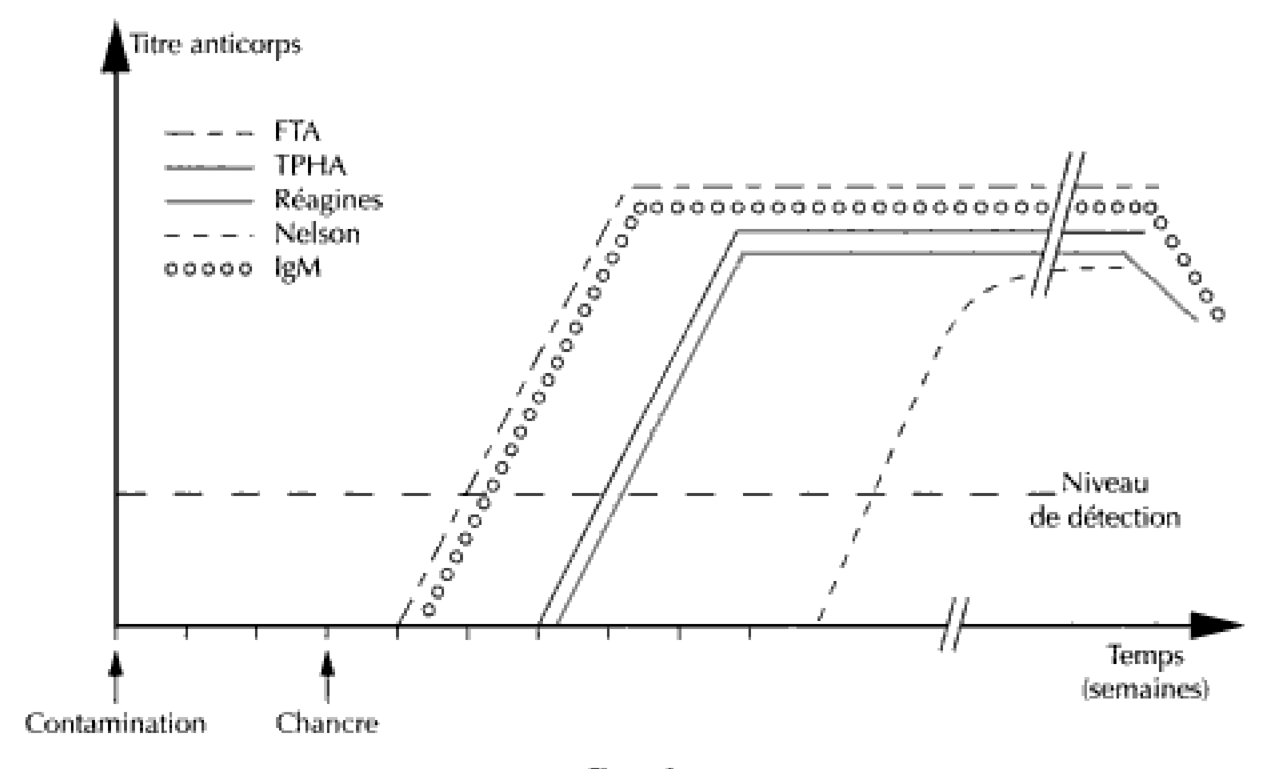


Figure 1.

Sa connaissance est nécessaire à l'interprétation des résultats. Elle est très schématiquement représentée dans la figure ci-dessus. Les anticorps détectés par le FTA abs test apparaissent les premiers, 8 à 10 jours après l'apparition du chancre. Environ 2 à 3 semaines après celle-ci, sont détectés les réagines et les anticorps impliqués dans le TPHA. Quant aux immobilisines, elles n'apparaissent qu'à la fin de la période primaire ou au début de la phase secondaire.

En l'absence de traitement, et en règle générale, les anticorps spécifiques vont persister indéfiniment, contrairement aux réagines dont le titre diminue au bout d'un certain temps. Un traitement précoce entraîne la diminution régulière et la disparition de tous les anticorps dans l'ordre inverse de leur apparition.

En revanche, au-delà du 6e mois, le traitement permettra difficilement une négativation totale, les anticorps spécifiques persistant en particulier toute la vie.

e) Interprétation des résultats sérologiques

Le diagnostic de la syphilis peut être suspecté cliniquement lors des manifestations de la syphilis qui caractérisent les phases primaire, secondaire et tertiaire. Il peut aussi, et c'est le cas le plus fréquent, être porté chez un patient asymptomatique pour lequel une sérologie positive a été découverte lors d'un examen systématique.

- Première circonstance : il existe des signes cliniques évocateurs.

Devant une lésion suspecte de *syphilis primaire*, on peut se trouver au début en phase présérologique, l'ensemble des réactions pratiquées donnant des résultats négatifs. Il ne faut donc pas éliminer une syphilis sur une sérologie négative à ce stade, mais répéter l'examen 8 ou 15 jours plus tard après avoir tenté de mettre en évidence le tréponème dans la sérosité du chancre au microscope à fond noir, ou en immunofluorescence.

La recherche des IgM antitréponèmiques et le FTA abs sont les méthodes de choix pour faire le diagnostic le plus précoce possible, quand l'examen direct se révèle négatif, le VDRL et le TPHA étant plus tardifs. Une sérologie dissociée peut donc être observée à ce stade, avant que tous les tests ne se positivent.

Au stade de *syphilis secondaire*, toutes les réactions donnent des résultats positifs. Les titres des anticorps sont élevés (VDRL $\geq$ 32) et il n'y a pas, en général, sur le plan sérologique, de problème diagnostique.

Au cours de la *syphilis tertiaire*, les réactions sont en général positives, avec des titres d'anticorps moins élevés que précédemment quand les manifestations de la maladie relèvent d'une multiplication tréponémique.

En revanche, quand elles résultent de phénomènes immunopathologiques comme dans certaines formes de neurosyphilis, les réagines peuvent manquer, conduisant à l'observation d'une sérologie dissociée.

Le diagnostic de neurosyphilis repose sur la mise en évidence d'anticorps antitréponèmiques dans le LCR, associés à une augmentation de laprotéinorachie et à une pléiocytose. Si la positivité du VDRL est un élément très évocateur, sa négativité dans le LCR ne permet pas d'éliminer une neurosyphilis.

En revanche, la positivité d'un TPHA et d'un FTA, nécessaire à l'établissement du diagnostic, peut aussi traduire un simple passage d'immunoglobulines sériques à travers la barrière hémoméningée. La mise en évidence d'une synthèse interthécale d'immunoglobulines (quotient albumine, index TPHA) est alors recommandée.

- Seconde circonstance : découverte d'une sérologie positive en l'absence de tout symptôme ou signe clinique connu.

Dans le cas d'une *syphilis latente récente* (contamination < 1 an), les résultas de la sérologie sont comparables à ceux observés au cours d'une syphilis primaire ou secondaire.

Dans le cas d'une *syphilis latente ancienne* (contamination > 1 an), les résultas sont souvent moins évocateurs et les titres d'anticorps en général moins élevés. On peut ici aussi se trouver devant une sérologie dissociée ; ce sont les réagines et les IgM qui, cette fois, sont manquantes. La distinction entre infection asymptomatique susceptible d'évoluer et cicatrice sérologique témoin d'une immunité ancienne s'avère impossible si la notion d'un traitement antibiotique antérieur n'a pas été retrouvée à l'interrogatoire.

f) Cas particuliers

• Diagnostic sérologique de la syphilis congénitale

Bien que celle-ci soit devenue extrêmement rare dans notre pays, elle pose un problème délicat. Il faut, en effet, trancher entre affection évolutive chez le nouveau-né, qui peut être alors parfaitement asymptomatique, et transfert passif d'anticorps maternels.

Le diagnostic repose classiquement sur l'évolution des anticorps au cours des trois premiers mois, leur diminution progressive traduisant un transfert passif et leur augmentation une infection. La recherche d'IgM antitréponémiques qui, ne traversant pas le placenta, signent par leur présence dans le sérum du nouveau-né une syphilis congénitale, est intéressante. Mais la possibilité de résultats négatifs à tort à la naissance impose dans tous les cas un contrôle à la fin du troisième mois.

• Diagnostic de tréponématose non vénérienne

La découverte d'une sérologie positive chez un sujet en provenance de régions du monde où sévissent des tréponématoses non vénériennes est difficile à interpréter : aucune réaction sérologique ne permet de différencier la syphilis des autres tréponématoses (pian, syphilis endémique, pinta).

• Surveillance du traitement

Les réactions sérologiques sont aussi utilisées pour la surveillance biologique du traitement bien qu'il n'existe pas de critère absolu de guérison, le clinicien peut suivre la diminution progressive des réagines avec une réaction de Kline ou du VDRL, quantitative. Elles s'avèrent préférables à un TPHA ou à un FTA quantitatifs pour lesquels des titres élevés d'anticorps appartenant à la classe des IgG persistent toute la vie, quand le traitement a été tardif. Ici aussi, la recherche des IgM antitréponémiques devrait aider le praticien : elles disparaissent en effet après l'instauration d'un traitement pénicilliné.

Note : La législation française, modifiée en octobre 1980, impose au laboratoire :
Pour un examen systématique, une réaction de chacun des 2 groupes suivants :

- groupe 1 : réaction de Kline, réaction du VDRL, réaction du VDRL charbon ;
- groupe 2 : FTA abs test, TPHA.

Pour un examen de contrôle avant ou en cours de traitement, une réaction quantitative de chacun des deux groupes.

• Surveillance sérologique au cours de l'infection par le VIH

Bien que le tableau clinique de la syphilis soit très comparable, certaines caractéristiques ont été rapportées : chancres multiples et extensifs, évolution plus rapide vers la neurosyphilis.

Au plan sérologique aussi, si la majorité des sujets infectés par le VIH ont une réponse comparable à celle des sujets non infectés, il faut souligner la possibilité de fausses positivités du VDRL, de sérologie restant négative dans des cas de syphilis évolutive et de non-diminution du titre des réagines (VDRL) après traitement. Cela a conduit aux États-Unis le *Center for Disease Control* à relever la posologie pénicillinée et à recommander une surveillance sérologique accrue après traitement.

5. Sensibilité aux antibiotiques

T. pallidum est sensible à la pénicilline, aux tétracyclines, aux macrolides et résistant aux aminosides.
Le traitement varie selon le stade de la syphilis :
- syphilis précoce : (contamination < 1 an) 1 injection IM d'extencilline ;
- syphilis tardive : (contamination > 1 an) 3 injections IM à 3 semaines d'intervalle.

B. *Haemophilus ducreyi*

1. Historique

Haemophilus ducreyi a été observé pour la première fois dans un chancre mou par Ducrey en 1889. Cette bactérie a été classée dans le genre *Haemophilus* car elle exige de l'hémine pour sa croissance.

2. Épidémiologie

Haemophilus ducreyi, agent du chancre mou, IST qui sévit essentiellement dans les zones tropicales et subtropicales. Néanmoins, le nombre de cas semble en augmentation dans les pays développés (USA : 1 000 cas dans les années soixante, 5 000 cas à la fin des années quatre-vingt).
En France, en 1979, 348 cas ont été déclarés, en 1980, 218, et en 1981, 215. Il est plus fréquent chez les hommes que chez les femmes mais des formes atypiques sont de plus en plus rapportées.
Le chancre mou existe dans tous les pays du monde mais l'affection est endémique dans les régions tropicales et subtropicales d'Afrique et d'Asie. En Europe, il est devenu rare, trouvé occasionnellement dans les ports. Dans plus de 90 % des cas, le chancre mou est observé chez l'homme.

3. Pouvoir pathogène

Il s'agit d'une infection localisée en général aux organes génitaux externes, auto-inoculable, très contagieuse, la transmission se faisant presque toujours au cours d'un rapport sexuel. La période d'incubation de la maladie est classiquement courte, entre 1 et 3 jours. Il apparaît au niveau de la région génitale et périanale une papulo pustule qui s'ulcère très vite. D'autres ulcérations apparaissent ensuite par auto-inoculation. Par la suite, entre 1 et 2 semaines apparaît une fois sur trois une adénopathie inguinale satellite.

4. Diagnostic

a) Prélèvement

Il doit s'effectuer au niveau de la zone de décollement périphérique, en grattant sans faire saigner avec une curette ou un écouvillon vaginal. On peut également réaliser une biopsie au bord de l'ulcération.

La ponction du bubon doit être faite avec une seringue d'au moins 200 mL et une grosse aiguille, de façon à exercer une aspiration suffisante.

b) Examen direct

Le frottis est coloré au bleu de méthylène. *Haemophilus ducreyi* est un coccobacille de 1,25 à 2 µm de long sur 0,5 à 0,6 µm de large. Il est immobile, acapsulé et asporulé. La rétention du colorant au niveau des extrémités arrondies lui donne un aspect en épingle de sûreté, ou en navette.

c) Culture

Il ne cultive pas en milieu usuel. L'isolement n'est obtenu qu'une fois sur deux dans les meilleurs cas. Parmi les milieux de culture complexes proposés, on peut retenir la gélose chocolat avec 1 % d'isovitalex.
La culture serait favorisée à 33 °C par une atmosphère enrichie de 5 % de CO_2. Les colonies visibles entre 2 et 5 jours sont petites, grisâtres. En milieu liquide, les bacilles donnent un aspect dit en chaîne de bicyclette assez évocateur. La sensibilité de la culture est supérieure à 80 %. Des tests PCR ont été développés.
La recherche de *Treponema pallidum* doit, en parallèle, être systématiquement pratiquée, ainsi que des examens sérologiques de syphilis.

5. Sensibilité aux antibiotiques

Haemophilus ducreyi est souvent résistant aux bêtalactamines (par production de bêtalactamases), peut être résistant aux tétracyclines, au chloramphénicol, aux sulfamides et aux aminosides.
Les souches sont généralement sensibles au cotrimoxazole, à l'érythromycine, aux céphalosporines de troisième génération, aux fluoroquinolones et à l'azithromycine.
Pour le traitement, on conseille de ne jamais utiliser les tréponémicides afin d'éviter de décapiter une syphilis. L'administration du traitement est conseillée pendant 15 jours.
Traitement recommandé :
- azithromycine : 1 g par voie orale 1 seule dose ;
- ou ceftriaxone 250 mg IM 1 seule dose ;
- ou ciprofloxacine 500 mg voie orale 2 fois/jour pendant 3 jours ;
- ou érythromycine 500 mg voie orale 3 fois/jour pendant 7 jours.

Ne pas utiliser la ciprofloxacine chez la femme enceinte ou qui allaite.
On a rapporté des isolements de souches avec des résistances intermédiaires à la ciprofloxacine ou à l'érythromycine.

C. Le lymphogranulome vénérien ou maladie de Durand-Nicolas-Favre

1. Historique

Signalée en 1786 par John Hunter, cette maladie a été décrite dès 1913 par Durand, élève de Nicolas et de Favre.

2. Épidémiologie

En France, c'est une maladie exceptionnelle : 3 cas sont rapportés en 1981, 2 en 1982 et 2 en 1983.
Elle est fréquente en Amérique du Sud, sur la côte Ouest de l'Afrique, aux Caraïbes, en Australie, en Afrique du Nord, en Extrême-Orient, au Maroc, aux Indes (la prostitution portuaire joue un rôle important dans la propagation de la maladie). On note une progression dans certains pays à la suite de la pratique de rapports buccaux et aussi de la sodomie.
Le lymphogranulome vénérien est dû à certains sérotypes de *Chlamydia trachomatis* (L1, L2 et L3).

3. Pouvoir pathogène

Dans les pays développés à climat tempéré, où il est plus fréquent, le processus pathologique serait plus bénin que celui observé en Amérique du Sud, en Asie du Sud ou en Afrique. La période d'incubation est de 3 à 30 jours. La lésion primaire est une lésion vésiculaire : elle s'ulcère dans les 2 semaines ; 2 à 3 semaines plus tard, une adénopathie inguinale se développe, qui est la manifestation majeure. Chez la femme, elle peut passer inaperçue.

4. Diagnostic

a) Prélèvements

Ils sont effectués à partir du produit de grattage des lésions. Il faut éviter de faire une biopsie à cause du danger de fistulisation.

b) Culture

Le diagnostic peut se faire par culture sur cellules Mac Coy pour isolement de *Chlamydia trachomatis*.

c) Sérologie

Le diagnostic est porté par la sérologie. On utilise une réaction d'immunofluorescence. Dans presque tous les cas, la séroconversion est significative.

5. Sensibilité aux antibiotiques

C'est celle des *Chlamydias*. Des traitements de longue durée sont recommandés (3 semaines).

D. La donovanose (*Calymmatobacterium granulomatis*)

1. Historique

La donovanose a été décrite probablement en premier par Mc Leod en 1882, mais l'agent causal était découvert par Donovan en 1905 à Madras. Il s'agit de *Calymmatobacterium granulomatis*.

2. Épidémiologie

Maladie des pays tropicaux ou subtropicaux, elle atteint électivement les gens de couleur, exceptionnelle en Europe et au Japon. Elle est considérée comme une infection à transmission sexuelle.
La maladie est endémique en Asie du Sud-Est, dans le sud de l'Inde, en Papouasie-Nouvelle-Guinée et dans certaines régions d'Afrique, en particulier dans le sud de l'Afrique (OMS 1981). La donovanose est la première cause d'ulcération génitale en Papouasie-Nouvelle-Guinée.
La transmission sexuelle est soupçonnée mais pas prouvée.

3. Pouvoir pathogène

Il s'agit d'une infection granulomateuse chronique de la peau de la région génitale et du périnée. Au début, les papules évoluent en ulcération irrégulière, se transformant en masse granulomateuse. La période d'incubation est mal définie, se situant probablement entre 8 et 80 jours.

4. Diagnostic

Il se fait uniquement par examen microscopique après coloration au May Grünwald Giemsa. On peut mettre en évidence de nombreuses cellules mononucléées et des bacilles intra ou extracellulaires en aspect d'épingle double et à la coloration bipolaire. C'est un bacille à Gram négatif, présentant des relations antigéniques avec les *Klebsiella*. Peuvent être aussi observés les corps de Donovan correspondant à la présence de bactéries dans les cellules.
Les lésions peuvent développer secondairement une infection bactérienne, ou être co-infectées par un autre agent pathogène sexuellement transmis.

5. Sensibilité aux antibiotiques

Calymmatobacterium granulomatis est sensible cliniquement aux tétracyclines, aux aminosides, au chloramphénicol. Le traitement par les cyclines donne de bons résultats mais doit être conduit jusqu'à nettoyage des lésions 15 jours environ.
Traitement recommandé (au moins 3 semaines) :
- doxycycline 150 mg par voie orale 2 fois/jour ;
- ou triméthoprime/sulfaméthoxazole (850 mg/160 mg) 2 fois/jour.

E. *Herpes simplex* virus 2

1. Historique

Il s'agit d'une infection connue depuis l'Antiquité. La première description remonte à 1736 par Jean Astrie, médecin du roi Louis XV.

2. Épidémiologie

Le nombre d'infections à *Herpes virus* augmente d'année en année, représentant 13 % du total des IST aux USA. La classe d'âge la plus atteinte pour la primo-affection herpétique génitale se situe entre 18 et 20 ans.

3. Pouvoir pathogène

Herpes simplex type 2 est un virus à tropisme génital, à transmission sexuelle prédominante ou encore de la mère infectée à son enfant. Il s'agit d'un virus enveloppé à ADN et à symétrie cubique.

Manifestations cliniques

• Chez l'homme

La primo-infection se traduit par une balanoposthite pouvant être associée à une urétrite.

• Chez la femme

Vulvo-vaginite aiguë fébrile avec parfois réaction péritonéale ou méningée associée.

• Chez les deux sexes, la lésion herpétique évolue de la vésicule à l'ulcération.
  - Lors de la primo-infection, l'excrétion virale est prolongée, s'étendant entre 13 et 15 jours. Les réactivations surviennent chez 10 à 15 % des sujets infectés de façon latente. Pendant les réactivations, la multiplication de *Herpes simplex* virus 2 au niveau des lésions met entre 6 et 8 jours ;
  - La méningite lymphocytaire herpétique est rare ;
  - Les infections latentes : au site initial de la multiplication virale, le virus gagne les ganglions lombo-sacrés ;
  - L'herpès néonatal disséminé : il interviendrait dans 1 cas sur 7 500 naissances. L'infection est transmise des voies génitales de la mère à son nouveau-né pendant l'accouchement ou un peu avant celui-ci ;
    C'est une véritable septicémie virale dont le pronostic est très sombre. La plupart des infections intra-utérines entraînent la mort du fœtus plutôt que de provoquer des malformations ; le risque de transmission à l'enfant lors de l'accouchement, qui est de 50 % environ, chute à moins de 10 % si l'on pratique une césarienne ;
  - *Herpes simplex* 2 et le cancer du col ou de la vulve : la promiscuité sexuelle semble être un facteur favorisant l'infection.

Herpes simplex virus 2 ne serait pas directement en cause dans la genèse de ces tumeurs qui se dérouleraient en étapes multiples. L'infection répétée par *Herpes simplex* virus 2 préparerait localement l'intervention d'autres virus oncogènes, en particulier certains *Papillomavirus*.

4. Diagnostic

Il se fait au niveau des organes génitaux au moyen d'écouvillon humidifié.
On recherche sur le frottis des cellules géantes multinucléées avec inclusions spécifiques par la coloration de Papanicolaou.
Une détection antigénique aussi sensible que la culture sur des lésions vésiculeuses ou ulcérées précoces peut être réalisée par plusieurs méthodes : recherche de l'antigène intracellulaire par immunofluorescence ou par réaction immunoenzymatique.
En immunofluorescence, l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-HSV1 et anti-HSV2 permet le typage du virus.
La culture reste la méthode de référence.

Les nouvelles techniques de biologie moléculaire (PCR) ont tendance à remplacer les autres tests.

a) Culture

Elle ne pose pas de problèmes particuliers car *Herpes simplex* virus 2 se multiplie rapidement sur un grand nombre de cellules cultivées (cellules diploïdes humaines, cellules amniotiques humaines, cellules de rein de lapin, de hamster, de singe primaire, etc.).

b) Identification

L'effet cytopathogène caractéristique apparaît entre 24 et 48 heures. Ce sont des foyers d'arrondissement cellulaire qui gagnent tout le tapis. Le typage est indispensable. Il peut se faire par immunofluorescence indirecte grâce à des anticorps monoclonaux.

c) Diagnostic sérologique

Il n'a pas un intérêt considérable, sauf dans les infections primaires et pour la mise en évidence d'un contact ancien lors d'une greffe (présence d'IgG). Dans les réinfections, il n'y a pas ou peu de variations de titre. Les méthodes Elisa sont les plus sensibles.

5. Sensibilité aux antiviraux

Pour l'herpès génital, l'aciclovir à raison de 5 comprimés de 200 mg/jour pendant 10 jours a donné des résultats satisfaisants (confort augmenté, diminution de l'excrétion virale) mais malheureusement, on a observé par la suite le même taux de réactivation chez des sujets témoins.
D'autre part, 0 à 5 % des souches sont résistantes vis-à-vis de l'antiviral.

III. Tumeurs virales bénignes

A. Les condylomes acuminés

1. Introduction

Reconnues par Benjamin Bell, ce sont des affections très fréquentes.
Il s'agit de tumeurs épithéliales bénignes, virales, contagieuses et auto-inoculables.
Le virus responsable fait partie des *Papovavirus*.
Il a été retrouvé dans les noyaux de cellules des couches supérieures du corps de Malpighi. La contamination est habituellement sexuelle. Certaines situations peuvent favoriser l'apparition des végétations vénériennes : diabète, grossesse, certaines affections hématologiques, traitements immunodépresseurs ou corticoïdes.

2. Pouvoir pathogène

Aspect clinique : le délai d'incubation est difficile à préciser, entre 4 et 12 semaines. Les condylomes sont situés au niveau du méat urétral ou du sillon balanoprépucial. Les complications sont les condylomes géants décrits par Buschke et Lowenstein en 1932.
Condylome + cancer : chez la femme, le rôle de *Human papillomavirus* dans la carcinogénèse du cancer cervical a été évoqué dans de récentes études. L'origine virale de la lésion condylomateuse urétrale dans un cas de carcinome intra-épithélial a été confirmée. Sont particulièrement impliqués les sérotypes 16 et 18.

3. Diagnostic

Ce virus n'est pas cultivable en culture cellulaire. Le diagnostic ne se fait que d'après l'aspect clinique.
Pour le traitement, la podophyline est largement utilisée ; on utilise également une crème 5-fluoro-uracyl. Autres techniques : l'électrocautérisation, la technique cryochirurgicale ou l'excision chirurgicale.

B. Le *molluscum contagiosum*

Il s'agit de petites tumeurs de la peau dues à un poxvirus. Les éléments siègent au niveau de la verge et de la vulve, se propagent à l'occasion des rapports sexuels, mais peuvent se rencontrer en n'importe quelles régions du tégument.
La période d'incubation se situe entre 2 semaines et 3 mois. Les éléments se présentent sous forme de petites élévations hémisphériques blanchâtres, et ombiliquées en leur centre. Le diagnostic se fait comme pour les condylomes acuminés, sur l'aspect clinique.
Le traitement consiste à extirper le contenu central de chaque élément à la curette et à cautériser, soit à la teinture d'iode, soit par électrocoagulation, soit par cryothérapie.

L'essentiel de la question

Malgré les connaissances acquises, les progrès faits dans la découverte du rôle de nouveaux organismes, la maîtrise des techniques de diagnostic, une augmentation du nombre d'infections sexuellement transmissibles a été notée dans le monde entier durant le dernier quart de siècle et particulièrement dans les pays industrialisés, faisant de ces maladies un problème de santé publique.
Les agents des infections classiques comme la gonococcie ou la syphilis n'ont pas été éradiqués. Même si, avec l'émergence du Sida, on a assisté dans un premier temps à une diminution de leur nombre, on constate une recrudescence dans tous les pays depuis 2000. Infection bénigne, la gonococcie peut s'avérer grave en cas de non-traitement et l'apparition de souches résistantes à la pénicilline, aux tétracyclines et maintenant aux quinolones impose une surveillance de l'antibiogramme.
Le rôle de certains organismes comme *Chlamydia trachomatis*, dont la culture nécessitait des techniques lourdes maintenant relayées par des tests moléculaires sensibles et spécifiques, a été démontré.

La fréquence de ces infections (50 millions dans le monde) et les lourdes séquelles qu'elles peuvent entraîner justifient les nombreux travaux qui leur sont consacrés. Actuellement, *Chlamydia trachomatis* est responsable de 60 à 80 % des salpingites observées dans les pays industrialisés.
Les nouvelles méthodes de diagnostic (biologie moléculaire) ont permis :
- l'évolution des prélèvements avec mise en place de techniques permettant au patient de les réaliser lui-même ;
- un dépistage précoce de certaines IST comme celles dues à *Chlamydia trachomatis.*

Les infections dues à *Herpes simplex* virus 2 représenteraient 13 % du total des IST aux USA, le chancre mou et la donovanose sont endémiques dans les pays tropicaux et subtropicaux, et une personne sur cinq contracterait une trichomonase durant sa vie.
La vaginose bactérienne, résultant d'une modification de la flore vaginale après l'apparition de *Gardnerella vaginalis* associé à *Mycoplasma hominis* et divers anaérobies, n'est pas une IST *stricto sensu.* Mais elle est retrouvée d'une manière significative chez les femmes actives sexuellement et chez celles ayant une sexualité à risques. Comme d'autres infections génitales bactériennes, elle peut être à l'origine de complications impliquant le haut appareil génital.
Enfin, il semble maintenant démontré que des infections génitales bactériennes sont associées à des risques accrus vis-à-vis de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine, tant en matière de susceptibilité que d'infectiosité.

Pour en savoir plus

- De Barbeyrac B., Bebear C. Chlamydia. *Med Mal Infect* 1997 ; 27 : 71-83.
- Lefevre J.-C. La vaginose bactérienne et ses conséquences en santé publique. *La Lettre de l'infectiologue* 2001 ; 12 : 5-13.
- Update of the CDC STD treatment guidelines : changes and policy. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR* 2002 ; 51 : 1-78.
- Acceptability of Self-Taken Vaginalis Swabs and First-Catch Urine Samples for the Diagnosis of Urogenital *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhœae* With an Amplified DNA Assay in Young Women Attending a Public Health Sexually Transmitted Disease Clinic. *Sex Trans Dis* 2006 ; 8 : 491-5.

Mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques

F. BARBUT, J.-C. PETIT
Service de bactériologie – virologie, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris.

La résistance bactérienne aux agents antimicrobiens est un problème d'importance croissante en pratique médicale. Si l'apparition des premiers antibiotiques (sulfamides en 1935 puis pénicilline au lendemain de la Seconde Guerre mondiale) avait suscité un espoir de voir les maladies infectieuses à jamais jugulées, ce dernier fut déçu très rapidement par l'apparition de bactéries devenues résistantes. L'utilisation ultérieure d'autres antibiotiques (streptomycine, chloramphénicol, tétracycline et érythromycine par ordre chronologique d'utilisation) connut une évolution comparable.
À l'heure actuelle, le phénomène de résistance bactérienne est connu pour toutes les familles d'antibiotiques. Il concerne toutes les espèces bactériennes qui pourront développer des mécanismes différents selon leur sensibilité initiale et leurs capacités à exprimer les diverses résistances. C'est la raison pour laquelle tous les médecins hospitaliers ou non sont concernés par les phénomènes de résistance, certes plus fréquents à l'hôpital, surtout mieux repérés et plus spectaculaires qu'en ville où, plus dispersés, ils passent plus volontiers inaperçus.
Il n'est pas possible d'arrêter les processus de résistance bactérienne, mais on peut limiter leur extension par une meilleure utilisation des antibiotiques fondée sur la connaissance de leur mécanisme d'action, de leur spectre antibactérien, des mécanismes biochimiques et du support génétique de la résistance.
Nous envisagerons successivement les différents mécanismes généraux responsables de la résistance bactérienne en les illustrant d'exemples précis.

I. Définitions

A. Phénotype de résistance (antibiotype)

La sensibilité ou la résistance à un antibiotique est généralement évaluée au laboratoire par la méthode de l'antibiogramme. Cette technique permet d'apprécier l'activité bactériostatique et de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un ou de plusieurs antibiotiques vis-à-vis d'une bactérie. La lecture de l'antibiogramme d'un germe permet de déterminer l'expression phénotypique de la résistance de ce germe à un ensemble d'antibiotiques, et par là même de suspecter le ou les mécanismes de résistance. L'étude du phénotype peut aussi représenter une aide à l'identification des bactéries, ou à la mise en évidence de souches épidémiques ou responsables d'infections nosocomiales.

B. Résistance *in vitro* (résistance « génétique »)

Une souche est dite résistante *in vitro* lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotiques notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (rapport technique n° 210 de l'OMS, 1961).

C. Résistance *in vivo* (résistance « clinique »)

Une souche est dite résistante *in vivo* lorsque la concentration en antibiotique qu'elle est capable de supporter *in vitro* est notablement plus élevée que celle qu'il est possible d'atteindre *in vivo*.

II. Support génétique de la résistance

On distingue deux types de résistance selon leur origine.

A. La résistance naturelle

La résistance naturelle ou « intrinsèque » est un caractère d'espèce présent chez toutes les souches bactériennes de l'espèce ou du genre bactérien. Cette résistance naturelle fait partie du patrimoine génétique habituel de l'espèce. Elle contribue à définir le spectre antibactérien d'un antibiotique. Il en est ainsi de la résistance :
- des *Proteus mirabilis* aux tétracyclines ;
- des *Proteus*, des *Providencia* et des *Serratia* à la colistine ;
- des *Enterococcus* à la lincomycine ;
- des entérobactéries aux macrolides ;
- des *Klebsiella* à l'ampicilline et à la carbénicilline ;
- des streptocoques aux aminosides (bas niveau de résistance).

B. La résistance acquise

Elle apparaît avec l'emploi en thérapeutique des antibiotiques chez un certain nombre d'espèces bactériennes initialement sensibles. Cette résistance est *évolutive* : elle varie en fonction du temps, de la localisation (épidémie) et de l'utilisation des antibiotiques qui ne provoquent pas la résistance mais qui sélectionnent les bactéries résistantes. Les gènes de résistance peuvent être acquis par transformation de gènes étrangers provenant de chromosomes d'autres espèces ou être portés par des éléments mobiles (transposons, plasmides). L'acquisition de la résistance peut aussi résulter d'une mutation chromosomique *(tab. 1)*.

Tableau 1. Principales caractéristiques des deux types de résistance bactérienne

Résistance chromosomique par mutation	Résistance extra-chromosomique par plasmides
10 à 20 % Rare, observée surtout avec : – streptomycine – rifampicine – acide fusidique – quinolones	80 à 90 % Fréquente, observée avec : – bêtalactamines – aminosides – chloramphénicol – tétracyclines – macrolides et apparentés – sulfamides – triméthoprime
Indépendante de l'antibiotique	Directement liée à l'antibiotique
Spécifique d'une famille	Non spécifique, mais touchant volontiers plusieurs groupes différents d'antibiotiques à partir de l'administration d'un seul d'entre eux
Héréditaire, stable	Épidémique, explosif

1. La résistance par mutation chromosomique

a) Définition

Dans ce cas, la résistance dépend d'une mutation au niveau du chromosome bactérien, responsable de la modification ou de la perte d'un gène pouvant entraîner :

- une modification de perméabilité à un ou plusieurs antibiotiques (cas des porines ou du lipopolysaccharide de paroi) ;
- une modification de la cible pariétale (cas des protéines liant la pénicilline ou PLP) ou intracellulaire (ADN gyrase pour les quinolones, ARN polymérases, ribosomes).

b) Caractères de la résistance

Elle fut mise en évidence en premier (tests de fluctuation et des répliques de velours) et présente les caractères spécifiques de toute mutation chromosomique :

- c'est une variation *génétique*, *héréditaire* (transmissible à la descendance), *stable* (les fréquences des réversions sont équivalentes à celles des mutations) ;
- c'est un phénomène *rare* : dans toute population bactérienne sensible, il existe un mutant résistant pour 10^6 à 10^9 bactéries. Ce faible taux de mutation ne s'exprime habituellement pas en clinique, les moyens naturels de défense de l'organisme éliminant la bactérie résistante isolée.
  La mutation vers la résistance élève la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique concerné à un niveau variable : la résistance est dite à un seul échelon (*one step*) lorsqu'elle provoque une élévation très importante de la CMI. Elle s'observe par exemple avec la streptomycine, les rifamycines, l'acide fusidique, les quinolones. La résistance est dite à plusieurs échelons (*multiple steps*) lorsque des mutants ayant des niveaux de résistance variables sont isolés dans une population bactérienne où demeurent des éléments sensibles. Elle s'observe avec les pénicillines, les céphalosporines, les macrolides, les tétracyclines, le chloramphénicol et les aminosides ;
- c'est un phénomène *spontané* c'est-à-dire indépendant de l'antibiotique administré dont le rôle consiste seulement à laisser se développer les mutants résistants préexistants à son utilisation. Le délai de mise en évidence de ceux-ci dépend de l'importance de la population et surtout de la vitesse de croissance des bactéries : dans l'urine, un mutant résistant peut remplacer la population initiale en 24 heures ;
- c'est un phénomène *spécifique* ne touchant qu'une seule famille d'antibiotiques à l'intérieur de laquelle il va exister une résistance croisée (mais avec des niveaux de résistance variables) pour tous les produits. Il en est ainsi pour :
  - les bêtalactamines : pénicillines et céphalosporines,
  - le chloramphénicol et le thiamphénicol,
  - les aminosides,
  - les sulfamides,
  - la colistine et la polymyxine B.

c) Conséquences thérapeutiques

En thérapeutique courante, la résistance chromosomique appelle les remarques suivantes :

- la résistance par mutation représente 10 à 20 % pour l'ensemble des résistances cliniques acquises. Le risque de sélection est d'autant plus grand que la population est abondante (infections urinaires, suppurations abdominales) et il est surtout à craindre lors de la prescription d'un antibiotique vis-à-vis duquel la bactérie possède un taux de mutation élevé (quinolones, fosfomycine, rifamycines, acide fusidique) ;
- la prévention est possible par l'utilisation d'une association de deux antibiotiques car le risque de mutations simultanées à deux antibactériens est égal au produit des fréquences de mutation de la bactérie vis-à-vis de chacun d'entre eux pris séparément. Cela est à la base de la quadri ou triantibiothérapie utilisée pour le traitement de la tuberculose.

2. La résistance extrachromosomique

a) Historique

Elle fut mise en évidence au Japon en 1959 par Ochiai et Akiba qui ont montré que des colibacilles multirésistants pouvaient transmettre dans le tube digestif de l'homme (*in vivo*) leur résistance à des shigelles sensibles. Cette hypothèse a été vérifiée *in vitro* et a permis la découverte des plasmides de résistance ou facteurs R.

b) Définition

Cette résistance est donc liée à l'introduction dans la bactérie d'un élément génétique non chromosomique (plasmide R ou transposon) codant en général pour des protéines. Celles-ci peuvent conférer la résistance au nouvel hôte en :

- diminuant la concentration intracellulaire de l'antibiotique ;
- inactivant l'antibiotique ;
- modifiant la cible de l'antibiotique ;
- substituant une cible insensible à celle, sensible, normalement présente dans la bactérie (*by pass*).

c) Caractéristiques des plasmides

Les plasmides sont remarquables par :

- leur caractère *transférable* de bactérie à bactérie de la même espèce ou d'espèces différentes par simple contact (conjugaison chez les bacilles à Gram négatif), ou par l'intermédiaire d'un bactériophage (transduction chez les staphylocoques) ;
- leur capacité de *réplication* qui permet la répartition du plasmide chez les bactéries filles ;
- le fait qu'ils peuvent posséder *plusieurs* (jusqu'à 4 ou 5) *caractères* de résistance à la fois ;
- leur propriété *d'incompatibilité* : la présence d'un plasmide dans une bactérie empêche la pénétration du plasmide du même type ou la réplication de celui-ci.

d) Caractères de la résistance plasmidique

- C'est un phénomène *récent* qui existe chez la plupart des espèces bactériennes et qui est observé avec de nombreuses familles d'antibiotiques à l'exception des polypeptides, des quinolones, de la rifampicine et de l'acide fusidique vis-à-vis desquels, jusqu'à présent, il n'a pas été possible de mettre en évidence une résistance transférable ;
- Le *niveau de résistance* conféré par les plasmides est en général élevé d'emblée ;
- C'est un phénomène directement lié à l'utilisation de l'antibiotique : ainsi les antibiotiques à spectre large peuvent sélectionner dans les populations commensales de l'organisme les bactéries porteuses de plasmides R ;
- C'est un phénomène *non spécifique* d'une famille d'antibiotiques. Plusieurs groupes d'antibiotiques différents sont touchés après administration d'un seul d'entre eux ;
- La perte d'un ou plusieurs caractères de résistance est possible mais rare.

e) Transposons et intégrons

Les transposons et les intégrons sont des séquences d'ADN mobiles, capables de changer de localisation dans le génome en l'absence d'homologie entre les ADN (transfert entre 2 plasmides, ou entre un plasmide et un chromosome). L'intégron est une unité structurale mobile plus petite que le transposon. L'intégron comporte tous les éléments nécessaires à la capture de gènes mobiles en un site de recombinaison spécifique. Il s'agit en quelque sorte du génie génétique effectué par la bactérie dans laquelle les gènes de résistance existent sous forme de cassettes mobiles réarrangées, et qui forment des opérons de résistance fortement exprimés.

f) Conséquences thérapeutiques

En thérapeutique courante, la résistance extrachromosomique appelle les remarques suivantes :

- la résistance plasmidique représente 80 à 90 % des résistances cliniques acquises. Elle est surtout à craindre lors de l'utilisation d'un antibiotique à spectre large ;
- l'association de deux antibiotiques n'a aucun effet bénéfique ;
- la prévention est possible par l'utilisation d'antibiotiques à spectre étroit ou de produits pour lesquels aucune résistance plasmidique n'a été montrée ;
- l'apparition d'un nouveau plasmide R se fait toujours sur un mode épidémique et explosif.

III. Mécanismes biochimiques de résistance aux antibiotiques

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques, qu'ils soient d'origine plasmidique ou inscrits dans le chromosome bactérien, sont multiples *(tab. 2)* :

- absence d'accumulation de l'antibiotique dans la bactérie (par imperméabilité ou efflux) ;
- inactivation enzymatique de l'antibiotique ;
- modification de la cible des antibiotiques ;
- substitution de la cible.

Tableau 2. Principaux mécanismes de résistance acquise aux antibiotiques (d'après Coleman *et al.* 1994)

Mécanisme de résistance	Exemples d'antibiotiques
Inactivation enzymatique de l'antibiotique	*Bêtalactamines* (pénicillinases, céphalosporinases, bêtalactamases à spectre étendu...) *Chloramphénicol* (acétyltransférase) *Aminosides* (phosphorylase, acétylase, adénylase) *Macrolides* (hydrolase, acétyltransférase) Chloramphénicol
Altération de la cible (avec conservation des fonctions physiologiques de la cible)	*Aminosides* (sous-unité 16S de l'ARN ribosomal 30S) *Quinolones* (ADN gyrase, topoisomérase IV) *Rifampicine* (sous-unité b de l'ARN polymérase) *Tétracylines* (ARN ribosomal 30 S) *Macrolides* (sous-unité 50S de l'ARN 23S du ribosome) Fosfomycine
Diminution de l'accumulation intracellulaire de l'antibiotique par : – imperméabilité (entrée) – efflux augmenté (sortie)	Bêtalactamines, aminosides Tétracylines Quinolones Macrolides Chloramphénicol
Substitution de la cible (ou *by pass*)	Sulfamides Triméthoprime Bêtalactamines (PLP 2a) Glycopeptides (Van)

A. Modification de la pénétration des antibiotiques

1. Structure de la paroi bactérienne

La paroi des bactéries à Gram négatif est constituée d'une membrane externe composée de lipopolysaccharides (LPS), de phospholipides (PL) et de protéines. La partie hydrophobe de ces composés se trouve à l'intérieur de cette membrane alors que la chaîne polysaccharidique des LPS et les têtes polaires des PL forment la surface hydrophile de la membrane. La présence du LPS sur la face externe de la membrane rend celle-ci imperméable vis-à-vis des composés hydrophobes. Des protéines formant de véritables canaux (porines) assurent le passage de molécules hydrophiles de faible masse moléculaire par diffusion passive. Des cations métalliques divalents (Ca^{++}, Mg^{++}) réalisent des ponts entre les groupements phosphates et neutralisent plus ou moins la charge externe de la bactérie.
Sous cette membrane externe, à laquelle il est lié par une lipoprotéine, se trouve le peptidoglycane qui forme une structure assez lâche laissant diffuser les molécules. La membrane interne ou cytoplasmique assure l'intégrité du cytoplasme par sa perméabilité sélective. Des transporteurs protéiques (perméases) sont nécessaires au passage des molécules au travers de cette membrane ; l'espace délimité par la membrane externe et la membrane interne constitue l'espace périplasmique.
Les bactéries à Gram positif ne possèdent pas de membrane externe mais l'épaisseur du peptidoglycane est généralement plus importante que chez les bactéries à Gram négatif. La membrane interne assure les mêmes fonctions.
Chez certaines bactéries, on observe diverses structures externes (capsule, slime) de nature souvent polysaccharidique, susceptibles de modifier la charge de la bactérie et la diffusion des molécules.

2. Mécanismes d'entrée des antibiotiques dans la cellule bactérienne

La pénétration des antibiotiques à travers la paroi bactérienne s'effectue selon deux principaux mécanismes : adsorption et diffusion passive à travers la paroi, transport actif ou passif à travers la membrane.

a) Pénétration à travers la paroi bactérienne

Chez les bactéries à Gram négatif, le passage à travers la paroi dépend de l'hydrophilie de la molécule et de son état d'ionisation.

- Hydrophilie de la molécule : les antibiotiques hydrophiles de faible masse moléculaire diffusent à travers les pores de la paroi : ainsi les bêtalactamines empruntent les porines OmpF et OmpC alors que les tétracyclines pénètrent dans la cellule par les porines IA. Les antibiotiques hydrophobes passent à travers la couche phospholipidique dont l'accès est plus facile chez les mutants d'*Escherichia coli* dont le polysaccharide est plus court ;
- État d'ionisation de l'antibiotique : les substances chargées négativement passent difficilement à travers la paroi dont la partie interne est chargée négativement. Ces antibiotiques forment des chélates avec les cations dont Mg^{++} pour faciliter leur passage. Chez les bactéries à Gram positif, une forme chélatée avec le Mg^{++} facilite aussi la pénétration.

b) Pénétration à travers la membrane cytoplasmique

Elle peut s'effectuer selon deux mécanismes :

- diffusion passive à travers les phospholipides ne nécessitant pas d'énergie ;
- transport actif, nécessitant une source d'énergie. C'est le cas de la fosfomycine qui emprunte le système de transport des hexoses phosphates des entérobactéries et du staphylocoque.

3. Résistance par imperméabilité de la structure externe de la bactérie

Certaines bactéries produisent une capsule (*Klebsiella, Haemophilus, Neisseria, Streptococcus*) ou sécrètent le « slime » (*Pseudomonas*, *Staphylococcus*) de nature polysaccharidique, qui peuvent diminuer la diffusion des antibiotiques par un effet barrière ou une modification de la charge externe des bactéries.
La pénétration des aminosides *in vitro* est ralentie chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sécrétrices d'alginates.

4. Résistance liée à la structure de la membrane externe

a) Résistance aux antibiotiques lipophiles

Les entérobactéries possèdent une membrane externe fortement disymétrique par le positionnement du LPS qui rend ces bactéries imperméables aux antibiotiques lipophiles tels que les macrolides, l'acide fusidique ou les rifamycines. Ce mécanisme explique certaines résistances naturelles des entérobactéries à ces antibiotiques.

b) Résistance aux antibiotiques hydrophiles

Les antibiotiques hydrophiles traversent la membrane externe à travers des porines ; ce passage est conditionné par la taille, l'hydrophobicité et la charge de la molécule ainsi que par l'état (fermé ou ouvert) des porines. Les modifications ou

disparitions des porines ainsi que leur état fonctionnel entraînent une imperméabilité de la membrane externe à l'antibiotique qui emprunte ce passage.
Ainsi, une mutation des gènes de régulation de la transcription des gènes codant pour les porines OmpC et OmpF d'*Escherichia coli* conduit à une diminution de l'activité des antibiotiques empruntant cette voie (bêtalactamines, aminosides, quinolones, triméthoprime, chloramphénicol). De même, une mutation survenant au niveau du gène codant pour la porine D2 spécifique du transport des carbapénèmes de *Pseudomonas aeruginosa* entraîne une résistance isolée de cette bactérie à l'imipénème.

5. Résistance liée à une modification de la perméabilité de la membrane interne

Le passage de la membrane interne fait appel à un transport actif consommant de l'énergie. Les bactéries anaérobies ou initialement fermentatives comme les streptocoques ont un faible potentiel de membrane et/ou un faible système de transport des électrons ; elles sont donc incapables de fixer ou d'absorber les molécules d'aminosides, ce qui explique la résistance naturelle de ces bactéries à ces antibiotiques.

B. Résistance par efflux actif

L'efflux actif consiste en l'activation d'une pompe qui chasse l'antibiotique hors de la cellule bactérienne.
Le premier exemple décrit d'efflux transmembranaire est celui de la résistance à la tétracycline liée aux protéines T et qui exportent l'antibiotique en utilisant une force générée par les protons. Depuis, de nombreux autres systèmes d'efflux actif ont été identifiés chez les bactéries et rendus responsables de résistance à des antibiotiques très variés comme les fluoroquinolones (pompe NorA de *Escherichia coli*) ou à des antiseptiques. Une des caractéristiques des systèmes d'efflux actifs est que ceux-ci peuvent parfois entraîner la résistance simultanée à des antibiotiques non reliés structurellement, et ainsi constituer de véritables systèmes de multirésistance. Par exemple, le groupe de gènes *marRAB*, présent à l'état naturel chez *Escherichia coli*, peut entraîner, après mutation, une résistance aux quinolones, aux chloramphénicols, aux cyclines et aux bêtalactamines.

C. Mécanismes d'inactivation enzymatique

1. Inactivation des bêtalactamines

Les pénicillines et les céphalosporines sont deux classes d'antibiotiques bêtalactamiques les plus fréquemment utilisées en pathologie infectieuse. Elles agissent en inhibant les enzymes (transpeptidase ou carboxypeptidase rassemblées sous le nom de PLP pour protéines liant les pénicillines) indispensables à l'étape finale de synthèse du peptidoglycane. La principale cause de résistance aux bêtalactamines est une dégradation de l'antibiotique à médiation enzymatique, notamment par les bêtalactamases.

a) Historique

La première bêtalactamase a été découverte en 1940 chez *Escherichia coli*. Depuis, de nouvelles enzymes ont été mises en évidence : pénicillinases, pénicillinases à large spectre, céphalosporinases déréprimées et bêtalactamases à spectre étendu.

b) Classification

De nombreuses méthodes ont été utilisées pour classer les bêtalactamases (Ambler, Matthew, Richmond-Sykes et plus récemment Bush). Ces classifications reposent sur l'affinité de ces enzymes vis-à-vis de différents substrats, leur point isoélectrique, la nature de leurs inhibiteurs, leur localisation génétique (plasmidique ou chromosomique), leur localisation bactérienne (exocellulaire ou périplasmique), etc.

c) Biosynthèse

Les gènes *bla*, qui contrôlent la synthèse des bêtalactamases, peuvent être soit chromosomiques, soit plasmidiques, soit transférables, portés par des transposons (TEM-1, SHV-1, TEM-2, PSE-1).
La synthèse est soit constitutive (bêtalactamase plasmidique des bacilles à Gram négatif, céphalosporinase de *Bacteroïdes fragilis*) soit inductible (bêtalactamase de *Staphylococcus aureus*, céphalosporinases des entérobactéries et de *Pseudomonas aeruginosa*).
La localisation cellulaire dépend des bactéries productrices : les bêtalactamases des bactéries à Gram positif sont extracellulaires, celles des bactéries à Gram négatif intracellulaires.

d) Mode d'action

Les bêtalactamases sont des enzymes capables d'hydrolyser le cycle bêtalactame, entraînant ainsi l'inactivation de l'antibiotique.

e) Les pénicillinases

Les *pénicillinases chromosomiques constitutives* sont spécifiques d'espèces et confèrent à ces bactéries une résistance naturelle. On les retrouve chez *Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Levinea malonatica et Levinea amalonatica* (SHV-1). Le bas niveau de production de ces enzymes fait que les bactéries sont résistantes aux aminopénicillines et carboxypénicillines, mais restent sensibles aux autres bêtalactamines.

- L'association d'une bêtalactamine et d'un inhibiteur de bêtalactamase (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) permet une récupération du moins partielle de l'activité de la bêtalactamine ;
- Les *pénicillinases plasmidiques* confèrent à la bactérie une résistance acquise ;
- La *pénicillinase* du *Staphylococcus aureus* est inductible en présence de faibles concentrations de certaines bêtalactamines (par exemple de pénicilline G) et entraîne une résistance à la pénicilline, aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et aux uréidopénicillines mais la sensibilité aux autres bêtalactamines reste conservée. Ce caractère inductible impose la détection de la pénicillinase de *Staphylococcus aureus* après induction : en pratique, il faut faire une culture préalable sur gélose en présence d'un disque de céfoxitine ou d'oxacilline et prélever les colonies en bordure de la zone d'inhibition pour rechercher la pénicillinase.

La détection de cette enzyme nécessite l'utilisation de céphalosporines chromogènes (disques de céfinase), la diminution de l'activité des pénicillines étant mal détectée sur l'antibiogramme standard ; cette méthode est préconisée pour *Haemophilus, Neisseria, Branhamella, Staphylococcus* sensible à la pénicilline G et *Pasteurella*.

Les pénicillinases des bacilles à Gram négatif sont nombreuses (TEM-1, TEM-2, OXA-1, PSE-1, etc.) et non inductibles. Environ 75 % des bêtalactamases isolées des entérobactéries sont des TEM-1 alors que chez *Pseudomonas aeruginosa*, on retrouve majoritairement des enzymes de type PSE et OXA. Ces enzymes sont codées par des plasmides et donc facilement transférables : c'est la raison pour laquelle on retrouve TEM-1 chez des espèces différentes (*Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Pseudomonas aeruginosa*) sans lien taxonomique entre elles. Les pénicillinases plasmidiques des bacilles à Gram négatif confèrent aux bactéries qui les produisent à haut niveau une résistance aux aminopénicillines, carboxypénicillines, uréidopénicillines, amidinopénicillines, céphalosporines de 1re et de 2e génération. Cependant, elles conservent leur sensibilité aux céphalosporines de 3e génération (sauf cefsulodine et céfopérazone), aux céfamycines, aux monobactames, aux oxa1-céphèmes et carbapénèmes. Elles sont inhibées (plus ou moins bien selon la quantité d'enzymes produites) par les inhibiteurs enzymatiques.

Ces pénicillinases plasmidiques ne diffèrent des pénicillinases chromosomiques qu'au niveau de leur production, beaucoup plus élevée que ces dernières, induisant une hydrolyse des uréidopénicillines et céphalosporines.

f) Les céphalosporinases

Ce sont des bêtalactamases chromosomiques produites naturellement à bas niveau par un certain nombre d'espèces : *Serratia marcescens, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Pseudomonas aeruginosa, Providencia stuartii, Citrobacter freundii, Proteus indole+, Morganella morganii, Acinetobacter sp, Alcaligenes sp*, etc. Ces bêtalactamases inductibles peuvent devenir constitutives (synthèse à haut niveau) à la suite d'une mutation génétique. On parle alors de céphalosporinases déréprimées.

- Induction

  La synthèse de céphalosporinases peut être induite principalement par une bêtalactamine, entraînant ainsi une production accrue de cette enzyme. Cette induction correspond en fait à l'inhibition d'un répresseur qui contrôle le gène *ampC* codant pour la céphalosporinase. Cette modification se traduit par une modification phénotypique : elle est transitoire et réversible au retrait de l'inducteur. Les espèces productrices de céphalosporinases sont naturellement résistantes aux aminopénicillines associées ou non aux inhibiteurs et aux céphalosporines de 1re génération. La sensibilité aux carboxypénicillines, uréidopénicillines, carbapénèmes et monobactames est conservée. Le caractère inductible de la production d'une céphalosporinase se traduit sur l'antibiogramme standard par la diminution de diamètre d'inhibition d'une bêtalactamine (céfotaxime ou ceftazidime par exemple), en regard d'une autre bêtalactamine fortement inductrice (céfoxitine ou imipénème). On obtient alors une image d'antagonisme. L'induction d'une céphalosporinase n'est pas responsable d'échec clinique.

- Dérépression
  Certaines bactéries (*Enterobacter sp.*, *Serratia sp.*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*) possédant une céphalosporinase inductible peuvent subir une mutation génétique (au niveau des gènes codant pour le répresseur qui devient inactif), entraînant une synthèse accrue de céphalosporinase indépendamment de la présence d'un inducteur. La céphalosporinase est dite alors déréprimée et ce, irréversiblement. Sa production à haut niveau entraîne une résistance à toutes les bêtalactamines sauf au mécillinam, à l'imipénème et au moxalactam.
  Ce phénomène de dérépression est responsable d'échec thérapeutique. Ce mécanisme constituerait chez *Pseudomonas* la première cause de résistance aux céphalosporines de 3e génération.

g) Bêtalactamases à spectre étendu

Apparues en 1985 en France, les bêtalactamases à spectre étendu correspondent à la mutation de pénicillinases telles que SHV-1 ou TEM-1. Elles sont plasmidiques, transférables et sensibles aux inhibiteurs enzymatiques.
Elles ont été décrites chez toutes les entérobactéries : *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica*.
De nombreuses bêtalactamases à spectre étendu ont été identifiées et elles se caractérisent par leur point isoélectrique ou leur affinité pour certains antibiotiques, et par leur pouvoir « épidémiogène ». La présence d'une bêtalactamase à spectre étendu est mise en évidence au laboratoire par une image caractéristique dite en forme de « bouchon de champagne », entre les disques de ceftazidime (d'aztréonam ou de céfotaxime) et d'amoxicilline-acide clavulanique, distants l'un de l'autre de 3 cm. La présence d'une telle enzyme confère au germe l'hébergeant une résistance à toutes les bêtalactamines sauf l'imipénème, les céphamycines et le moxalactam.

2. Inactivation des aminosides

Dans le cas des aminosides, l'inactivation enzymatique est liée à une modification de l'antibiotique par des acyltransférases (AAC), des phosphotransférases (APH) ou par des nucléotidyltransférases (ANT).
Chaque enzyme reconnaît un certain nombre d'antibiotiques qu'il modifie et le niveau de résistance varie selon la classe d'enzyme et la cellule hôte.
La détection de ces enzymes est parfois délicate : en effet, les *Serratia* peuvent posséder une AAC6' qui confère une résistance à l'amikacine ; cependant, le diamètre observé sur l'antibiogramme standard correspond à une interprétation « sensible ». C'est en fait le phénotype de résistance (diminution des diamètres de la kanamycine, tobramycine et nétilmicine, et faible diminution de l'amikacine) qui permet de suspecter la présence de l'AAC6' et de rendre « résistant » à l'amikacine ; la lecture interprétative de l'antibiogramme est alors indispensable pour mettre en évidence des résistances parfois délicates à détecter.
La résistance à haut niveau des streptocoques aux aminosides correspond à l'acquisition par ces bactéries d'une enzyme modificatrice, susceptible d'inactiver l'aminoside si celui-ci réussit à y pénétrer. Dans ce cas, l'association aminoside-

bêtalactamine n'est plus synergique. La résistance à haut niveau touche tous les streptocoques mais surtout les entérocoques. La mise en évidence au laboratoire s'effectue à l'aide de disques fortement chargés en aminosides : kanamycine à 1 000 µg ou gentamicine à 500 µg.

3. Inactivation du chloramphénicol

La résistance au chloramphénicol est fréquemment liée à la présence d'un plasmide codant pour la synthèse d'une acyltransférase qui inactive l'antibiotique, le rendant incapable de se fixer sur sa cible (ribosome).

D. Résistance par modification de la cible

Le mécanisme d'action des antibiotiques passe le plus souvent par une étape de fixation de l'antibiotique au niveau de sa cible. Une modification de la cible peut entraîner une diminution de reconnaissance et une diminution d'efficacité de l'antibiotique. Ce mécanisme d'action est observé avec de nombreux antibiotiques (bêtalactamines, aminosides, quinolones, sulfamides, rifampicines) et chez de nombreuses espèces appartenant aux genres *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, entérobactéries, *Clostridium*…

1. Résistance aux bêtalactamines

Le mode d'action des bêtalactamines est lié à la capacité qu'elles ont de se fixer de façon covalente sur les protéines de liaison à la pénicilline (PLP), qui sont des enzymes (transpeptidases, carboxypeptidases) indispensables à la synthèse du peptidoglycane. La fixation des pénicillines aux PLP entraîne l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane et donc de la croissance bactérienne.

Chez les bactéries à Gram positif, c'est la modification des PLP qui représente le mécanisme principal de résistance non-enzymatique. Ces modifications peuvent être de différentes natures :

- *diminution* de l'affinité de la PLP essentielle pour les bêtalactamines (par exemple, PLP-2 de streptocoque A, PLP-1 de *Clostridium perfringens*). Dans ce cas, l'affinité est diminuée pour toutes les bêtalactamines mais de manière inégale selon leur type ;
- *augmentation* d'une PLP déjà présente. Par exemple, chez *Enterococcus faecium*, la PLP-5, présente normalement en faible quantité, peut augmenter de 10 à 20 fois chez les souches résistantes et entraîner une diminution de l'affinité des bêtalactamines en jouant le rôle de PLP essentielle, au détriment des autres PLP. La concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique vis-à-vis de la souche résistante dépend alors des quantités de bêtalactamines nécessaires à saturer cette PLP-5.

La résistance aux bêtalactamines chez les pneumocoques se distingue par le fait que plusieurs modifications des PLP sont nécessaires pour aboutir à la résistance.

Chez les bactéries à Gram négatif, l'altération des PLP n'a été que rarement démontrée ; elle a été mise en évidence chez *Neisseria gonorrhœae*, *Haemophilus influenzae*, *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Résistance aux aminosides

Pour les aminosides, le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution d'affinité de la molécule pour le ribosome. Pour obtenir une résistance clinique, il faut des mutations multiples, ce qui explique la rareté de ces mécanismes de résistance pour cette famille d'antibiotiques.

3. Résistance aux quinolones

Les quinolones sont des inhibiteurs de la synthèse d'ADN. Leurs cibles sont les enzymes impliquées dans le surenroulement et la décaténation du chromosome lors de la réplication : les gyrases et topoisomérases IV. Le principal mécanisme de résistance est lié à des mutations ponctuelles de ces enzymes ; il confère une résistance croisée aux quinolones, mais le niveau de résistance est variable en fonction des molécules.

4. Résistance aux macrolides et lincosamides

Les macrolides (érythromycine) et lincosamides (clindamycine) sont des antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique des bactéries en se liant à la sous-unité ribosomale 50S. La résistance à ces agents est due à une altération du site ribosomal cible (méthylation de l'adénine dans l'ARN ribosomal 23S). Pour les staphylocoques, l'expression phénotypique de la résistance peut être de deux types : constitutive ou inductible. Le phénotype inductible montre une résistance isolée à l'érythromycine et l'oléandornycine. En présence de ces antibiotiques, il y a induction de la résistance et l'on observe un phénotype identique au phénotype constitutif avec résistance à tous les macrolides, lincosamides et streptogramines B, mais conservation de la sensibilité aux streptogramines A.

5. Résistance aux rifamycines

Les rifamycines bloquent la transcription de l'ADN en différents ARN (messager, ribosomal et de transfert) en se fixant sur l'une des sous-unités de l'ARN polymérase ADN dépendante. Le principal mécanisme de résistance des bactéries est dû essentiellement à une modification de la cible, c'est-à-dire de l'ARN polymérase, par mutation chromosomique.

E. Résistance par substitution de la cible

1. Résistance aux antagonistes des folates : triméthoprime et sulfamides

La triméthoprime et les sulfamides bloquent les étapes de la synthèse des folates en inhibant, soit la dihydrofolate réductase (triméthoprime), soit la dihydroptéroate synthétase. Les bactéries peuvent résister à cette action par trois mécanismes :
- en augmentant la quantité de précurseur (l'acide para-aminobenzoïque) ;
- en augmentant la synthèse de ces enzymes (surproduction de dihydrofolate réductase normale à codage chromosomique) ;

- en produisant des enzymes ayant une plus faible affinité pour ces molécules (dihydroptéroate synthétase à codage plasmidique).

Les bactéries étant capables d'effectuer la synthèse de l'ADN directement à partir de la thymidine, il faut utiliser un milieu pauvre en thymidine pour détecter cette résistance : en effet, la carence en thymidine oblige alors la bactérie à emprunter la voie métabolique de synthèse et permet ainsi de visualiser son blocage par l'antibiotique.

2. Résistance de *Staphylococcus aureus* à la méticilline par acquisition d'une nouvelle PLP

Chez *Staphylococcus aureus*, la résistance à la méticilline est généralement due à l'hyperproduction d'une nouvelle PLP, la PLP-2a ou PLP-2' (codée par le gène *mecA*) pour laquelle les bêtalactamines n'ont qu'une faible affinité.
La nouvelle PLP-2a va prendre le rôle essentiel sur les autres PLP déjà présentes. La résistance hétérogène pourrait s'expliquer par l'inductibilité de cette PLP. Au laboratoire, l'expression de ce mécanisme de résistance est favorisée par la croissance du staphylocoque en milieu hypersalé ou à 30 °C. Ce mécanisme entraîne une résistance croisée vis-à-vis de toutes les bêtalactamines.

IV. Le phénomène de tolérance aux antibiotiques

Le phénomène de tolérance correspond à une augmentation très marquée de la concentration minimale bactéricide de l'antibiotique vis-à-vis du germe, alors que son effet bactériostatique semble peu ou pas touché. Ce phénomène est surtout marqué avec les bêtalactamines vis-à-vis de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*. Il s'explique par un déficit d'activation du système lytique de la bactérie, normalement activé par l'antibiotique. Il est mis en évidence au laboratoire par une dissociation des CMI et des CMB (rapport des CMB/CMI ≥ 32).

V. Persistance des bactéries

Cette résistance correspond à une persistance du germe *in vivo* même en présence de l'antibiotique. Son mécanisme implique la perte, ou la diminution structurelle ou fonctionnelle d'un gène. La modification du métabolisme bactérien explique alors la persistance du germe *in vivo* en présence de l'antibiotique. Le phénomène est observé avec de nombreux antibiotiques : bêtalactamines, aminosides, quinolones, tétracyclines, rifampicine…

VI. Associations de plusieurs mécanismes de résistance

Pour un germe et une famille d'antibiotiques donnés, il est fréquent d'observer plusieurs mécanismes de résistance associés : ainsi la résistance de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* et *Enterobacter* aux céphalosporines fait-elle souvent intervenir, à la fois un problème d'imperméabilité et une inactivation enzymatique, ou bien la présence de deux bêtalactamases.
Il est également fréquent d'observer, pour un germe donné, une résistance à plusieurs familles d'antibiotiques : par exemple, les *Staphylococcus* méticillino-résistants présentent souvent une résistance, non seulement aux bêtalactamines mais aussi aux aminosides et aux macrolides. Ces associations de résistance peuvent provenir d'un seul mécanisme (plasmide ou imperméabilité), ou d'une association de mécanismes indépendants.

Conclusion

Les bactéries ont acquis au cours du temps une résistance à toutes les classes d'antibiotiques actuellement employées, pouvant parfois poser des problèmes thérapeutiques majeurs (par exemple pour les entérocoques, le bacille pyocyanique ou les *Acinetobacter sp*).
Les nouvelles stratégies de lutte contre l'antibiorésistance reposent sur les modifications des antibiotiques actuellement utilisés et sur l'administration concomitante d'inhibiteurs d'enzymes bactériennes qui empêchent la dégradation des antibiotiques. La limitation de l'extension de l'antibiorésistance passe avant tout par des règles d'utilisation des antibiotiques actuellement disponibles : choix d'un antibiotique à spectre étroit lorsque l'agent bactérien est connu, utilisation d'une antibioprophylaxie de courte durée, limitation des traitements locaux et oraux par des antibiotiques dont l'administration par voie parentérale peut s'avérer nécessaire…
La responsabilité de l'emploi sans discrimination des antibiotiques dans l'émergence croissante de bactéries résistantes aux antibiotiques fait toujours l'objet de controverses, mais il semble prudent d'utiliser ces produits avec discernement afin de prolonger leur efficacité.

L'essentiel de la question

La résistance des bactéries aux antibiotiques est soit *naturelle* soit *acquise*. La résistance naturelle est toujours transmissible à la descendance car portée par le chromosome. Elle détermine le *phénotype sauvage* des espèces bactériennes vis-à-vis des antibiotiques.

La résistance *acquise* ne concerne, elle, qu'une proportion plus ou moins importante, variable dans le temps, d'une espèce ou d'un genre. La résistance repose sur l'acquisition d'un ou plusieurs mécanismes de résistance qui déterminent un phénotype de résistance. La résistance acquise est souvent médiée par des éléments génétiques mobiles (transposons ou plasmides) et a la faculté d'être transmissible horizontalement. Trois catégories de mécanismes rendent compte de la résistance acquise des bactéries aux antibiotiques :

- inactivation de l'antibiotique. C'est le mécanisme le plus fréquent. Il peut s'agir d'une destruction de l'antibiotique (hydrolyse des bêtalactamines par des bêtalactamases) ou d'une modification de la molécule (estérification des aminosides par les aminophosphotransférases) ;
- modification ou substitution de la cible de l'antibiotique. On peut observer une modification partielle de la nature de la cible, une modification du nombre (hyperproduction) ou un changement total (nouvelle cible). Ces modifications se font soit par mutation des gènes codant pour la cible (résistance acquise aux fluoroquinolones par modification de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV), soit par acquisition de gènes étrangers (résistance acquise des entérocoques aux glycopeptides) ;
- diminution de la perméabilité ou apparition de système d'efflux. La perméabilité concerne surtout les bactéries à Gram négatif (membrane externe) dont les porines s'obturent partiellement ou totalement ou disparaissent. Les systèmes d'efflux sont constitués de protéines particulières jouant le rôle de pompe à extrusion, utilisant une force proton-motrice et expulsant l'antibiotique dès qu'il apparaît dans la cellule bactérienne. Ils peuvent constituer des mécanismes de résistance multiples.

Pour en savoir plus

- Berche P., Gaillard J.-L., Simonet M. *Bactériologie*. Médecine-Sciences. Flammarion, Paris, 1988.
- Bryan L.-E. General mechanisms of resistance to antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1988 ; 22 (sup A) : 1-15.
- Bryskier A. *Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques*. Ellipses, Paris, 1999.
- Coleman K., Athalye M., Chancey A., Davinson M., Payne D.-J., Perri C.-R., Chopra I. Bacterial resistance mechanisms as therapeutic targets. *Antimicrob Agents Chemother* 1994 ; 33 : 1091-116.
- Courvalin *et al. L'antibiogramme* MPC Videom, Paris, 1986.
- Dever L.-A., Dermondy T.S. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch Intern Med*, 1991 ; 151 : 886-95.
- Duval J., Soussy C.-J. *Antibiothérapie*. Masson, Paris, 1986.
- Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. *Précis de bactériologie clinique*, Elsevier, ESKA, Paris, 2000.
- Jacoby G.-A., Aarcher G.-L. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N Engl J Med* 1991 ; 324 : 601-12.
- Jarlier V. Mécanismes de résistance aux antibiotiques. *Médecine thérapeutique*, 1991 ; Hors série 1 : 46-60.
- Le Minor L., Veron M. *Bactériologie médicale*. Médecine-Sciences. Flammarion, 2[e] éd Paris, 1989.
- Briand M. *Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques*. Masson, Paris, 1986.

Détermination de la sensibilité des germes aux antibiotiques

F. BARBUT, J.-C. PETIT
Service de bactériologie – virologie, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris.

Le choix d'une antibiothérapie au cours d'une infection dépend :
- *de la (les) bactérie(s) en cause ;*
- *de l'étude in vitro de la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques ;*
- *du site de l'infection ;*
- *des propriétés pharmacologiques des antibiotiques (diffusion, cinétique, toxicité...) ;*
- *du terrain (âge, état immunitaire...).*

*En pratique, le laboratoire de bactériologie détermine la sensibilité in vitro des germes à différents antibiotiques par l'**antibiogramme**, méthode courante d'évaluation approchée des **concentrations minimales inhibitrices** (CMI). Il peut être amené à mesurer in vitro la **concentration minimale** bactéricide d'un ou d'une association d'antibiotiques vis-à-vis du germe responsable du processus infectieux. Enfin, dans le cas d'infections plus sévères (endocardites, ostéites...), l'activité in vivo de l'antibiothérapie devra impérativement être contrôlée par la mesure du **pouvoir bactéricide** du sérum. La chronologie des opérations bactériologiques visant à déterminer la sensibilité des germes aux antibiotiques est résumée dans le tableau 1.*

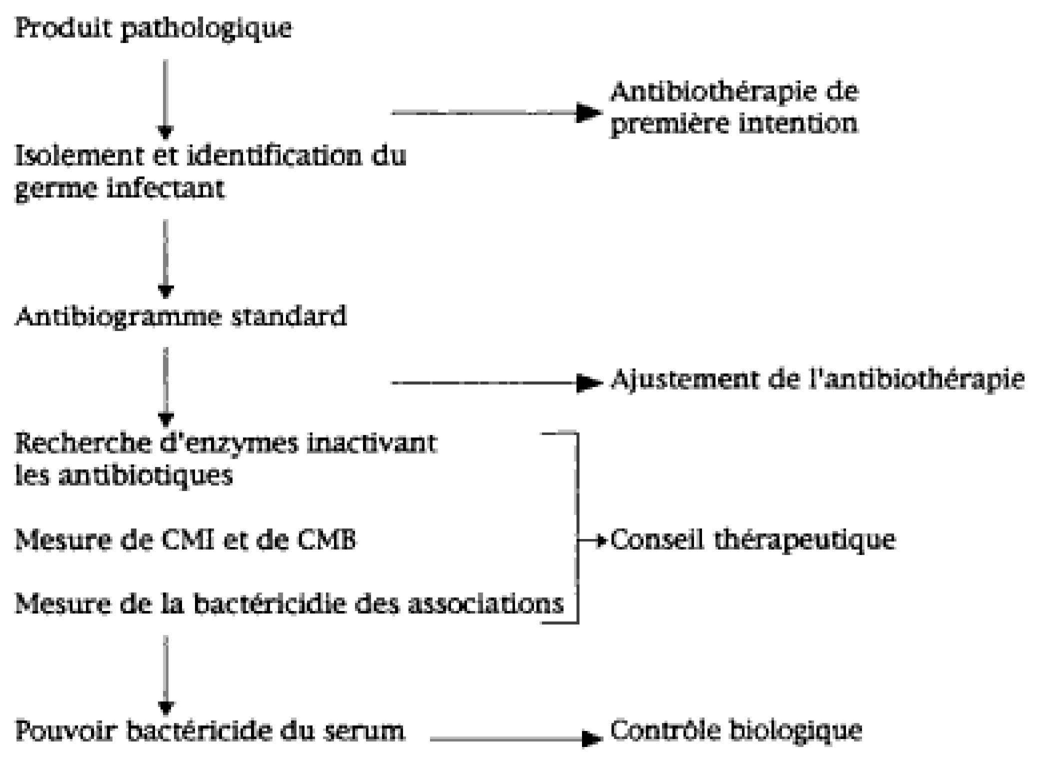


Tableau 1. Chronologie des opérations bactériologiques dans l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques

I. Rappels sur l'activité *in vitro* des antibiotiques

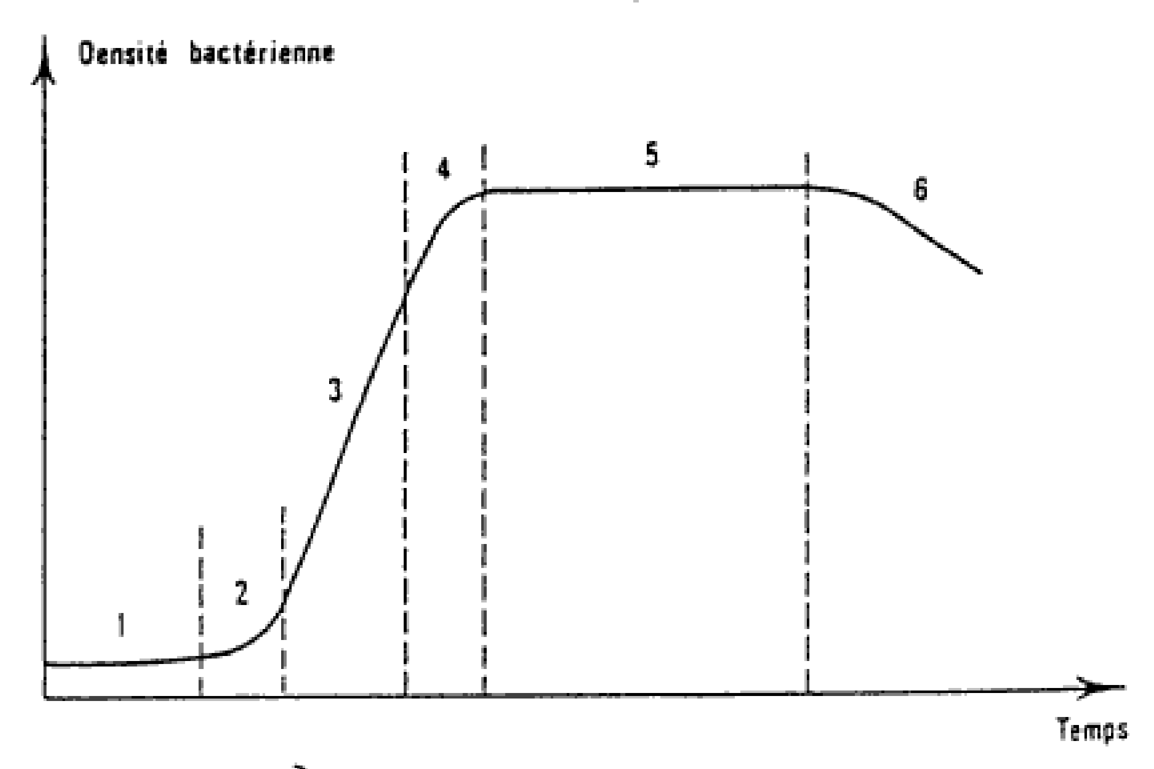
A. La croissance bactérienne

La *figure 1* résume la cinétique de croissance d'une population bactérienne en milieu liquide non renouvelé.

Quatre phases peuvent être distinguées :
- phase de latence ;
- phase de croissance exponentielle ;

• phase de ralentissement ;
• phase stationnaire (épuisement du facteur limitant).

Figure 1. Courbe de croissance bactérienne en milieu liquide non renouvelé (coordonnées semi-logarithmiques)



1. Phase de latence
2. Phase d'accélération } Durée de l'adaptation enzymatique
3. Phase exponentielle de croissance (temps de doublement bactérien constant et maximal)
4. Phase de ralentissement
5. Phase stationnaire en plateau (facteur limitant épuisé)
6. Phase de déclin

B. Croissance bactérienne en présence d'antibiotiques

La *figure* 2 montre l'évolution, en fonction du temps, d'une culture bactérienne (10^6 bactéries/mL de bouillon) en présence de concentrations définies d'antibiotiques. Le dénombrement des bactéries viables est réalisé à chaque temps sur un milieu dépourvu d'antibiotique. La lecture des courbes permet de dégager trois grands comportements bactériens définissant trois zones d'activité antibiotique :

• croissance bactérienne comparable à celle de la courbe témoin (c'est-à-dire sans antibiotique) : ce cas de figure est observé pour des *concentrations subinhibitrices* d'antibiotiques ;
• allongement du temps de latence et ralentissement de la croissance bactérienne : c'est la *bactériostase* définie par une entrave à la multiplication, sans que le nombre de germes numérés ne soit jamais inférieur au nombre de germes ensemencés ;
• diminution du nombre de bactéries viables : c'est la *bactéricidie*. L'effet de l'antibiotique est létal pour une partie de la population bactérienne. Parfois, l'action antimicrobienne est partielle et, après une diminution du nombre de bactéries, on assiste à une reprise de la croissance.

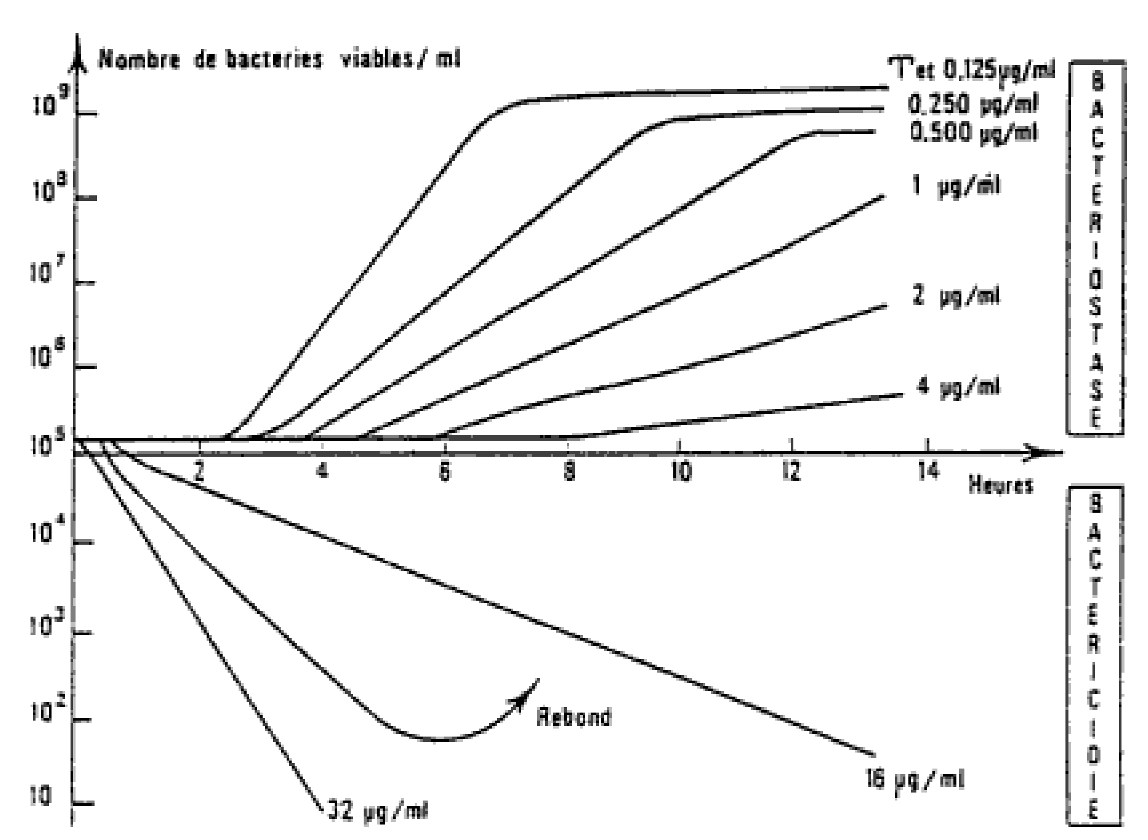


Figure 2. Cinétique de comportement d'un inoculum bactérien face à des concentrations croissantes d'antibiotiques

1. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La *figure 3* représente le nombre de bactéries viables, exprimé en pourcentage de l'inoculum initial après 18 heures d'incubation à 37 °C, en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'antibiotiques inhibant, après 18 ou 24 heures d'incubation, la multiplication des bactéries dans des conditions bien définies de milieu, d'inoculum, de température… Cette définition est à la base de la catégorisation des germes en « résistant », « sensible » ou « intermédiaire » vis-à-vis d'un antibiotique.

La précision de la CMI est faible car elle correspond à 100 % d'inhibition. L'intervalle de confiance d'une CMI est habituellement de ± 1,5 $\log_2$ de la concentration.

D'autres paramètres peuvent être utilisés :

- la CI50 (concentration inhibitrice 50) est la concentration d'antibiotiques inhibant 50 % de la population bactérienne étudiée. C'est une valeur précise car elle représente la sensibilité de la population moyenne. Elle est donc peu influencée par la taille de l'inoculum qui peut augmenter l'hétérogénéité de la population bactérienne ;
- la CI90 (concentration inhibitrice 90) est la concentration inhibant la croissance de 90 % des bactéries d'une population.

2. Concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide est définie comme la plus faible concentration d'antibiotiques détruisant, après 18 heures d'incubation à 37 °C, 99,99 % (99,9 % pour les Anglo-Saxons) d'une population bactérienne. Elle correspond donc à un abaissement du nombre de bactéries de 4 logarithmes de base 10.

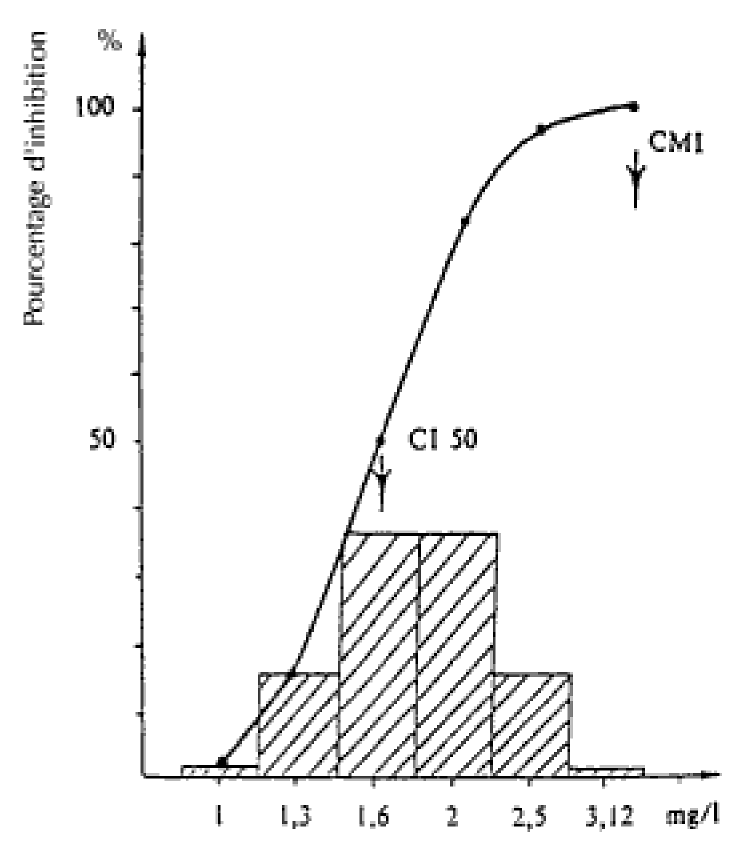


Figure 3. Nombre de bactéries viables, exprimé en % de l'inoculum initial (I = 100 %) après 18 heures d'incubation en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques

3. Cinétique de bactéricidie

C'est l'étude *in vitro* au cours du temps de la bactéricidie ; elle permet de mesurer la vitesse de bactéricidie et de distinguer les antibiotiques selon deux critères :

- effet bactéricide temps-dépendant (exemple : bêtalactamines) : la cinétique de bactéricidie est identique, dès la première concentration bactéricide, pour des concentrations variables d'antibiotiques ;
- effet bactéricide dose-dépendant (exemple : aminosides) : les courbes de bactéricidie varient en fonction des concentrations d'antibiotiques utilisées.

L'étude des courbes de bactéricidie permet de mettre en évidence différents phénomènes tels que :

- *l'effet rebond* : il correspond à une reprise de la croissance bactérienne. Ce phénomène peut être dû à une instabilité de l'antibiotique *in vitro*, à une hétérogénéité de la population bactérienne qui peut comporter un nombre de bactéries génotypiquement plus résistantes que l'ensemble de la population, ou à une induction d'enzymes conférant une résistance des bactéries à l'antibiotique ;
- *la bactériopause ou effet post-antibiotique* : ce phénomène a été décrit avec les macrolides et les synergistines ; lorsque l'on soustrait les germes à l'action de ces antibiotiques, il existe une période, entre 15 et 30 heures, durant laquelle les bactéries ne se multiplient pas, perdent leur pouvoir pathogène et deviennent plus sensibles aux défenses de l'organisme ;
- *la tolérance* : une bactérie est dite tolérante vis-à-vis d'un antibiotique lorsque le rapport CMB/CMI est au moins égal à 32 (exemple : pneumocoques, entérocoques, streptocoques du groupe B, staphylocoques, *Listeria monocytogenes*...). Ce phénomène correspond à l'absence de mise en jeu du système autolytique, on le

trouve avec les antibiotiques agissant sur la synthèse de la paroi (bêtalactamines et glycopeptides).

4. Définition des catégories cliniques

En l'absence d'accord international sur les bases permettant de délimiter les différentes catégories cliniques, le rapport n° 610 du Comité d'experts de la standardisation de l'OMS en confie le soin à une autorité nationale. En France, le Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CASFM) a arrêté les valeurs critiques des principaux agents antimicrobiens qui délimitent les catégories cliniques (antérieurement catégories thérapeutiques).

Les valeurs des concentrations et des diamètres critiques qui délimitent ces catégories résultent de l'intégration de plusieurs données : distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour les populations de souches sensibles et résistantes appartenant à diverses espèces, concentrations humorales et tissulaires obtenues avec des posologies recommandées, confrontation des résultats *in vitro* et des résultats cliniques, variabilité des méthodes statistiques utilisées.

Trois catégories ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : sensible (S), résistant (R) et intermédiaire (I).

Les *souches S* sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée.

Les *souches R* sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quel que soit le type de traitement.

Les *souches I* sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel la seule valeur de la CMI n'est pas prédictive du succès thérapeutique :

- elles peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible (pouvant entraîner leur classement dans la catégorie S) mais, *in vivo*, une partie de ces souches apparaissent résistantes à la thérapeutique ;
- elles peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression n'est pas suffisante pour justifier un classement dans la catégorie R mais qui favorise l'apparition d'une résistance *in vivo* au cours du traitement ;
- elles peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression n'est pas suffisante pour justifier un classement dans la catégorie R mais qui permet d'espérer un effet thérapeutique dans certaines conditions (fortes concentrations locales ou posologies accrues) ;
- la catégorie I est aussi une zone tampon qui tient compte des incertitudes techniques et biologiques.

Pour les principaux agents microbiens, des valeurs critiques des concentrations basse (c) et haute (C) et des diamètres d'inhibition correspondants (D, d) permettent la catégorisation selon les critères figurant dans le *tableau* 2.

La lecture interprétative de l'antibiogramme, fondée sur la connaissance des phénotypes de résistance, a pour but de transformer un résultat initialement catégorisé S, selon les valeurs critiques, en résultat I ou R en raison d'un risque d'échec thérapeutique. Les règles de lecture interprétatives sont précisées pour certaines espèces bactériennes ou groupes bactériens dans le communiqué annuel du Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Tableau 2. Critères de catégorisation selon les valeurs critiques

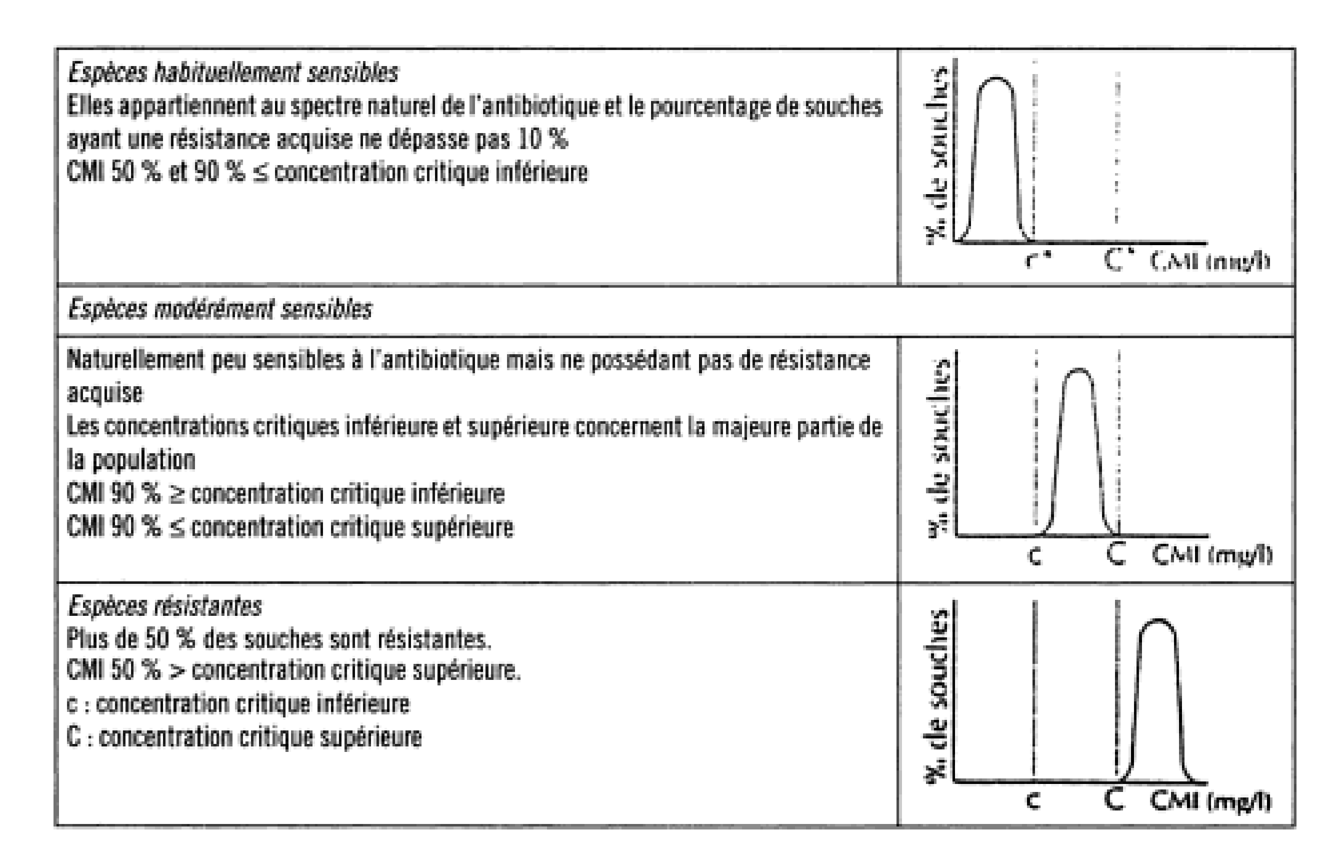
Catégories	CMI (mg/L)	Diamètres (mm)
S	CMI ≤ c	Diamètre ≥ D
R	CMI > C	Diamètre < d
I	c < CMI ≤ C	d ≤ Diamètre < D

5. Classification d'une espèce bactérienne dans le spectre clinique d'un antibiotique

Pour permettre au clinicien de connaître les indications bactériologiques précises d'un antibiotique, son activité et ses limites, les espèces bactériennes sont classées en 3 catégories qui prennent en compte des données biologiques et cliniques :

- les concentrations critiques proposées par le Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie ;
- les données pharmacocinétiques ;
- le spectre naturel de l'antibiotique ;
- les CMI 50 % et 90 % ;
- les résultats cliniques.

Les catégories sont définies ainsi :



Espèces habituellement sensibles Elles appartiennent au spectre naturel de l'antibiotique et le pourcentage de souches ayant une résistance acquise ne dépasse pas 10 % CMI 50 % et 90 % ≤ concentration critique inférieure	
Espèces modérément sensibles	
Naturellement peu sensibles à l'antibiotique mais ne possédant pas de résistance acquise Les concentrations critiques inférieure et supérieure concernent la majeure partie de la population CMI 90 % ≥ concentration critique inférieure CMI 90 % ≤ concentration critique supérieure	
Espèces résistantes Plus de 50 % des souches sont résistantes. CMI 50 % > concentration critique supérieure. c : concentration critique inférieure C : concentration critique supérieure	

La catégorie « inconstamment sensible » a été supprimée fin 1999. Elle correspondait à une espèce dont la fréquence de résistance s'échelonnait entre 10 % et 50 %. La nomenclature actuelle oblige à classer ces bactéries dans la catégorie « espèce sensible » en mentionnant conjointement la fourchette de pourcentage de résistance acquise.

II. Méthodes d'études de la sensibilité des germes aux antibiotiques

A. L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé

L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (ou méthode des disques) est un procédé largement répandu dans les laboratoires de bactériologie du fait de sa simplicité et rapidité d'exécution et de son faible coût. Cependant, la qualité des résultats peut varier en fonction de plusieurs paramètres qu'il importe de maîtriser par une standardisation de la méthode.

1. Principe : rappel des lois de diffusion en gélose

Lorsqu'un disque chargé d'antibiotique est déposé à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé par une suspension bactérienne, l'antibiotique diffuse spontanément en établissant un *gradient de concentration* : il s'établit alors une compétition entre la diffusion de l'antibiotique et la vitesse de croissance des bactéries. Après une incubation de 18 heures à 37 °C, le résultat de cette compétition se matérialise par l'apparition d'une plage d'inhibition de croissance bactérienne autour du disque d'antibiotique. La mesure du diamètre de cette plage permet de déduire la CMI approximative puis de catégoriser le germe étudié en « sensible », « résistant » ou « intermédiaire » vis-à-vis de l'antibiotique. Cooper et Woodman ont mathématisé la relation entre le diamètre d'inhibition et la diffusion de l'antibiotique selon l'équation :

$$X^2 = 4DT(\text{Log}C_o - \text{Log}C)$$

X = distance de progression depuis l'origine (= diamètre)
D = constante de diffusion de l'antibiotique
C_o = concentration à la source
C = concentration à la distance X
T = temps de l'observation
Dans le cas de l'antibiogramme, C est l'inconnue que la mesure de X permet de calculer.

2. Corrélation entre le diamètre d'inhibition et la CMI

L'antibiogramme est lu en mesurant le diamètre des plages d'inhibition. La figure géométrique, qui relie le diamètre obtenu par diffusion standardisée et la CMI correspondante mesurée par dilution en milieu gélosé, s'appelle la *courbe de concordance :* Cette courbe est construite pour chaque antibiotique en regroupant des centaines de souches d'espèces différentes et de CMI différentes, ainsi que des souches témoins. Elle est tracée sur papier semi-log avec les diamètres d'inhibition en ordonnées arithmétiques et les CMI en abscisses logarithmiques ; elle est établie une fois pour toutes pour une charge antibiotique donnée du disque. En pratique, il existe des abaques dérivés des courbes de concordances, sur lesquels on traduit directement le diamètre en CMI puis en catégories « sensible », « résistant » ou « intermédiaire ».

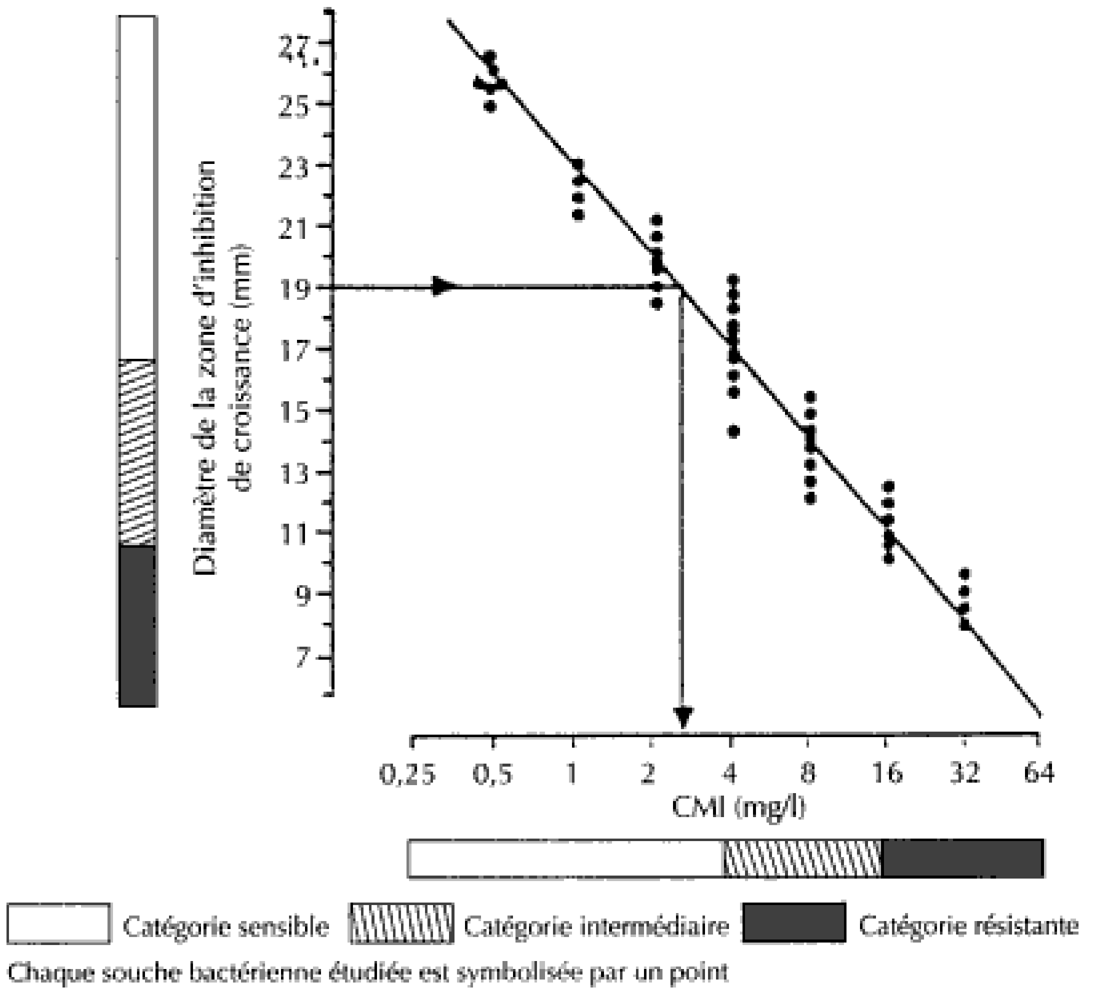


Figure 4. Courbe de concordance entre CMI et diamètre d'inhibition

3. Précautions techniques

De nombreux facteurs peuvent influencer la formation des plages d'inhibition :

- facteurs liés à l'environnement de la culture : température, atmosphère d'incubation, composition du milieu (pH, protéines, glucides, ions), épaisseur du milieu ;
- facteurs liés à l'antibiotique : charge du disque, aptitude à diffuser. La conservation des disques est un facteur important à considérer. Ils sont généralement conservés à + 4 °C et dans certains cas au congélateur à – 20 °C ;
- facteurs liés aux bactéries : effet inoculum, phase de croissance des bactéries.

Afin de garantir la reproductibilité et l'exactitude de la méthode, les conditions de réalisation doivent être parfaitement standardisées. En France, la méthode la plus utilisée répond aux normes édictées par l'OMS. L'antibiogramme doit être réalisé en milieu de Mueller Hinton de composition elle-même standardisée (pH 7,4, concentration en thymidine < 50 ng/mL, concentrations ajustées en Ca^{++} et Mg^{++}). L'épaisseur de la gélose doit être de 4 mm. L'inoculum doit en théorie être préparé à partir d'une culture en phase exponentielle de croissance (agitation 4 heures au bain-marie) et ajusté entre 2 et 3.10^6 bactéries/mL. L'ensemencement est réalisé par inondation de la gélose par quelques millilitres de l'inoculum. Les boîtes doivent être séchées 15 minutes à 37 °C avant de déposer les disques d'antibiotiques. Il est important d'observer une prédiffusion des antibiotiques de 30 minutes à température ambiante avant de porter les boîtes à l'étuve à 37 °C (en position renversée) pendant 18 heures.

Un contrôle de qualité rigoureux doit être effectué avec des souches témoins sensibles pour lesquelles sont connues les limites tolérables de diamètre. On utilise classiquement un *Staphylococcus aureus*, un *Escherichia coli* et un *Pseudomonas aeruginosa*.

4. Avantages et inconvénients

L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé présente de nombreux avantages :
- étude simultanée de nombreux antibiotiques permettant de réaliser des antibiotypes utiles aux études épidémiologiques ;
- simplicité et rapidité d'exécution ;
- contrôle immédiat de la pureté de la souche ;
- possibilité de détection de mutant résistant ou d'une résistance inductible ;
- possibilité de visualisation de synergies ou d'antagonismes à condition de placer judicieusement les disques d'antibiotiques ;
- système ouvert permettant l'introduction de molécules nouvelles.

En revanche, l'antibiogramme par diffusion ne permet qu'une approche de la CMI et cette méthode se prête mal aux germes à croissance lente ainsi qu'aux anaérobies. En outre, elle se heurte à des problèmes de diffusibilité de certains antibiotiques (par exemple les polypeptides).
C'est la raison pour laquelle, au moindre doute, on n'hésitera pas à contrôler ou à préciser ses résultats au moyen d'autres techniques d'étude *in vitro* des antibiotiques.

B. L'antibiogramme automatisé

Différentes méthodes de lecture automatisée sont apparues sur le marché français.

1. Systèmes utilisant deux concentrations d'antibiotiques (par exemple API ATB)

Ces systèmes utilisent deux cupules contenant chacune les concentrations critiques d'antibiotiques correspondant aux valeurs permettant la distinction entre « sensible » et « intermédiaire », et « intermédiaire » et « résistant ».
La croissance dans les deux cupules correspond aux souches résistantes, la croissance au niveau de la concentration basse correspond aux souches intermédiaires et aucune croissance correspond aux souches sensibles. La lecture s'effectue après 24 heures d'incubation soit à l'œil nu, soit par une méthode photométrique.

2. Antibiogramme rapide en milieu liquide

L'originalité de cette technique réside dans la mesure de cinétique de croissance des germes en présence d'une concentration d'antibiotiques judicieusement choisie. La catégorisation des souches en « sensibles », « intermédiaires » ou « résistantes » peut être réalisée entre 3 et 6 heures (par exemple VITEK, Rapid ATB, COBAS-Bact…).
La corrélation entre les résultats obtenus par ces systèmes et les CMI déterminées par la méthode de référence (méthode par dilution) est d'environ 85 %. La concordance dépend étroitement du couple bactérie-antibiotique. Les principales raisons de discordances sont essentiellement liées au mode d'action des antibiotiques, à la pousse en microagrégats, à une recroissance tardive, aux mécanismes de résistance

inductible, à la lyse tardive des bactéries. Certains appareils peuvent éviter quelques erreurs en analysant les courbes de cinétiques de bactéricidie (par exemple COBAS-Bact).

C. Détermination des CMI et des CMB

La détermination des CMI avec la méthode par dilution est celle de référence. Elle peut être réalisée en milieu liquide ou solide. Il est prudent d'introduire des souches de références comme contrôles à chaque série de tests.

1. Méthode par dilution en milieu gélosé

La méthode par dilution en milieu gélosé (milieu de Mueller Hinton) nécessite l'incorporation de chaque concentration d'antibiotique dans le milieu liquéfié (à 45 °C) et l'utilisation d'un ensemenceur à tiges multiples (dérivé de l'appareil de Steers) délivrant 1 à 5 µL de l'inoculum de chaque bactérie étudiée (10^4 bactéries par spot). La CMI est définie comme la concentration d'antibiotique ne laissant subsister aucune, ou au plus, 1 à 3 colonies après 18 heures d'incubation à 37 °C.

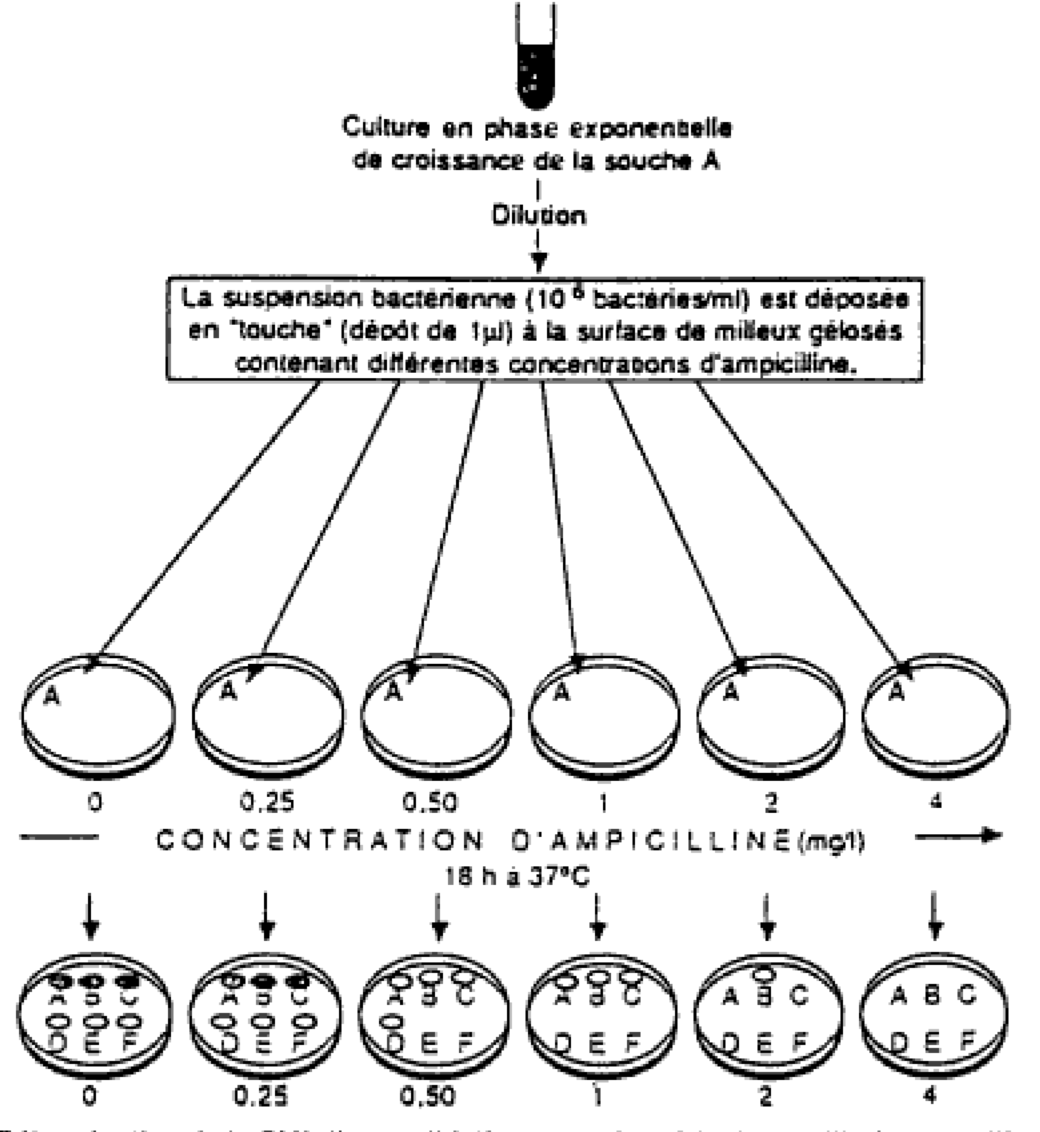


Figure 5. Détermination de la CMI d'un antibiotique avec la méthode par dilution en milieu solide

Cette technique, considérée comme la méthode de référence de détermination des CMI, présente l'avantage de pouvoir tester un grand nombre de souches bactériennes vis-à-vis d'une concentration d'antibiotique. Elle est cependant difficilement utilisable en routine et elle ne permet pas la détermination des CMB.

2. Méthode par dilution en milieu liquide

La méthode par dilution en bouillon Mueller Hinton peut être réalisée en tubes (macrométhode) ou en plaques (microméthode).

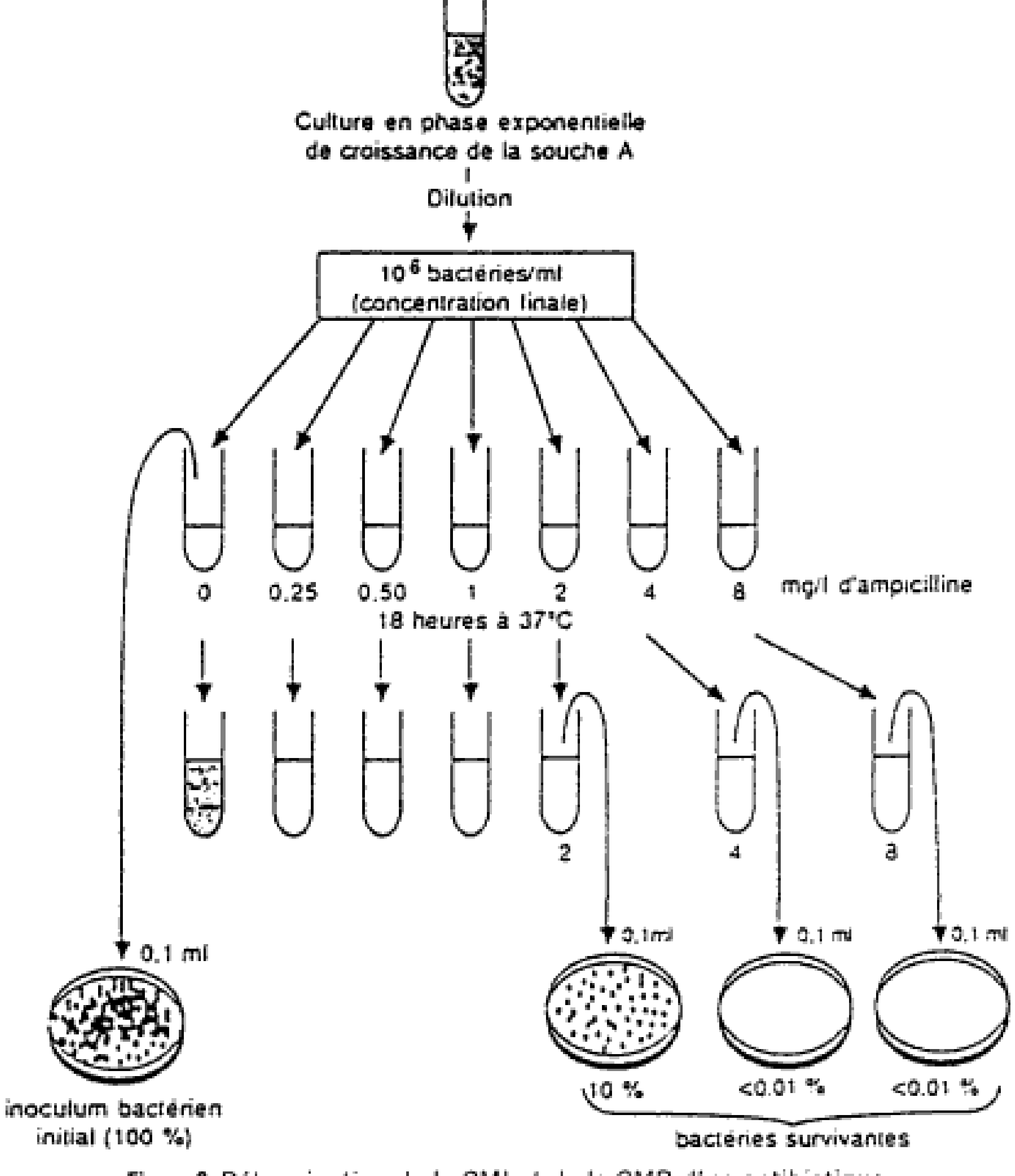


Figure 6. Détermination de la CMI et de la CMB d'un antibiotique avec la méthode par dilution en milieu liquide

En pratique, on distribue dans un premier temps dans une série de tubes à hémolyse (ou dans les cupules d'une microplaque), sous un même volume, des concentrations décroissantes d'antibiotiques (en progression géométrique de 2). Puis on

ajoute, dans un second temps, dans chacun des tubes (cupules), sous un même volume, des bactéries en phase exponentielle de croissance de façon à obtenir une concentration finale d'environ 10^6 bactéries/mL.
La CMI de l'antibiotique vis-à-vis de la souche étudiée est définie comme la plus faible concentration inhibant après 18 heures d'incubation à 37 °C toute croissance bactérienne visible à l'œil nu.
La CMB peut être déterminée en repiquant (par la méthode des stries ou par étalement en râteau sur un milieu approprié) les tubes sans croissance bactérienne visible, et en calculant le pourcentage de germes survivant par rapport à une gamme étalon préalablement établie en parallèle.
La gamme étalon (ou témoin de dénombrement) est réalisée en diluant de 10 en 10 l'inoculum de départ ; 0,01 mL de chaque dilution est prélevé à l'anse calibrée et déposé sous forme d'une strie de 5 cm sur une boîte de gélose. Un autre procédé de dénombrement consiste à étaler au râteau 0,1 mL de chaque dilution sur une gélose. Les boîtes sont incubées 18 heures à 37 °C.
Plusieurs facteurs peuvent entraîner des variations de la mesure de la CMB : composition du milieu de culture, taille de l'inoculum bactérien, phase de croissance des bactéries (stationnaire ou exponentielle), agitation et transport d'antibiotique. Le transport d'antibiotique (ou *carry-over*) est dû au transfert d'une certaine quantité d'antibiotique sur les géloses de dénombrement. Il peut augmenter artificiellement la bactéricidie. Pour limiter ce phénomène, il est possible d'utiliser des géloses contenant des inhibiteurs d'antibiotiques variables selon les produits.
La détermination des CMI peut être réalisée à l'aide de galeries prêtes à l'emploi (ATB CMI ; Microméthode SENSITITRE) possédant des cupules dans lesquelles sont déposées, sous forme déshydratée, différentes concentrations d'un antibiotique. Le repiquage des cupules sans croissance visible permet la détermination des CMB à condition d'avoir préalablement réalisé une boîte de gélose témoin. Ces galeries sont cependant limitées par le choix des antibiotiques.

3. Méthode du E-test

La méthode du E-test n'est pas, à la différence des deux précédentes, une technique par dilution, mais une méthode par *diffusion en milieu gélosé*. Des bandelettes, imprégnées d'un *gradient d'antibiotique*, sont déposées sur une gélose préalablement ensemencée par une culture bactérienne calibrée et en croissance exponentielle. Après 18 heures d'incubation à 37 °C, on observe une plage d'inhibition en forme de poire dont l'intersection avec la bandelette graduée permet une lecture directe de la CMI.
Cette méthode simple, rapide et bien corrélée avec la méthode de référence, est actuellement réalisable pour de nombreux antibiotiques.
Néanmoins, le coût élevé du E-test en limite son usage. Il peut être utilisé à chaque fois qu'il est recommandé de mesurer rapidement la CMI d'un antibiotique de manière précise (par exemple, pour les souches de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline G, ou encore pour les souches de *Staphylococcus* présentant un diamètre inférieur à 17 mm aux glycopeptides).

D. Étude de l'activité d'une association d'antibiotiques *in vitro*

1. Justification d'une association d'antibiotiques

Certaines circonstances cliniques obligent le médecin à employer une association d'antibiotiques. Quatre motifs essentiels justifient une telle décision :

- le traitement des infections polymicrobiennes (par exemple la péritonite) ;
- la prévention de l'émergence de mutants résistants dont le risque est particulièrement élevé avec certains antibiotiques (quinolones, rifamycines, fosfomycine par exemple) ;
- le traitement en urgence d'infections graves avant l'isolement du germe responsable ; l'association d'antibiotiques a pour but de couvrir un spectre large ; le traitement sera réajusté en fonction des résultats bactériologiques ;
- la nécessité d'obtenir un effet synergique et bactéricide rapide indispensable pour assurer la guérison d'infections graves en raison de leur siège (endocarde, sang, os, articulation, cerveau) ou du terrain sur lequel elles se développent (immunodéprimés).

2. Définitions des interactions

Il existe quatre possibilités d'interactions entre deux antibiotiques :

- *la synergie* : l'effet de l'association est supérieur à la somme des effets produits par chaque molécule ;
- *l'addition* : l'effet de l'association est égal à la somme des effets produits par chaque molécule ;
- *l'indifférence* : l'effet de l'association est égal à celui obtenu avec la molécule la plus active ;
- *l'antagonisme* : l'effet de l'association est inférieur à l'effet obtenu avec la molécule la plus active.

3. Mesure *in vitro* de l'effet d'une association

a) Mesure qualitative : technique de diffusion

Cette technique, qui repose sur le principe de la diffusion des antibiotiques en milieu gélosé, est facile à réaliser et permet l'étude de nombreuses associations, à la fois en termes de bactériostase, et en termes de bactéricidie.

En pratique, l'étude de la *bactériostase* d'une association est réalisée en déposant à la surface d'une gélose, ensemencée par une suspension bactérienne et de manière perpendiculaire, deux bandelettes de papier buvard imprégnées des antibiotiques à étudier. Après 18 heures d'incubation à 37 °C, on observe une plage d'inhibition de croissance bactérienne parallèle à chaque bandelette. L'étude minutieuse de l'intersection des deux zones d'inhibition permet de déduire le type d'interaction. Les bactéries qui sont situées dans la zone d'inhibition sont soit tuées, soit quiescentes.

L'effet *bactéricide* de chaque antibiotique ou de leur association peut être évalué en appliquant une membrane de cellophane stérile sur les boîtes précédentes et en la transférant sur une gélose sans antibiotique. Après une nouvelle période d'incuba-

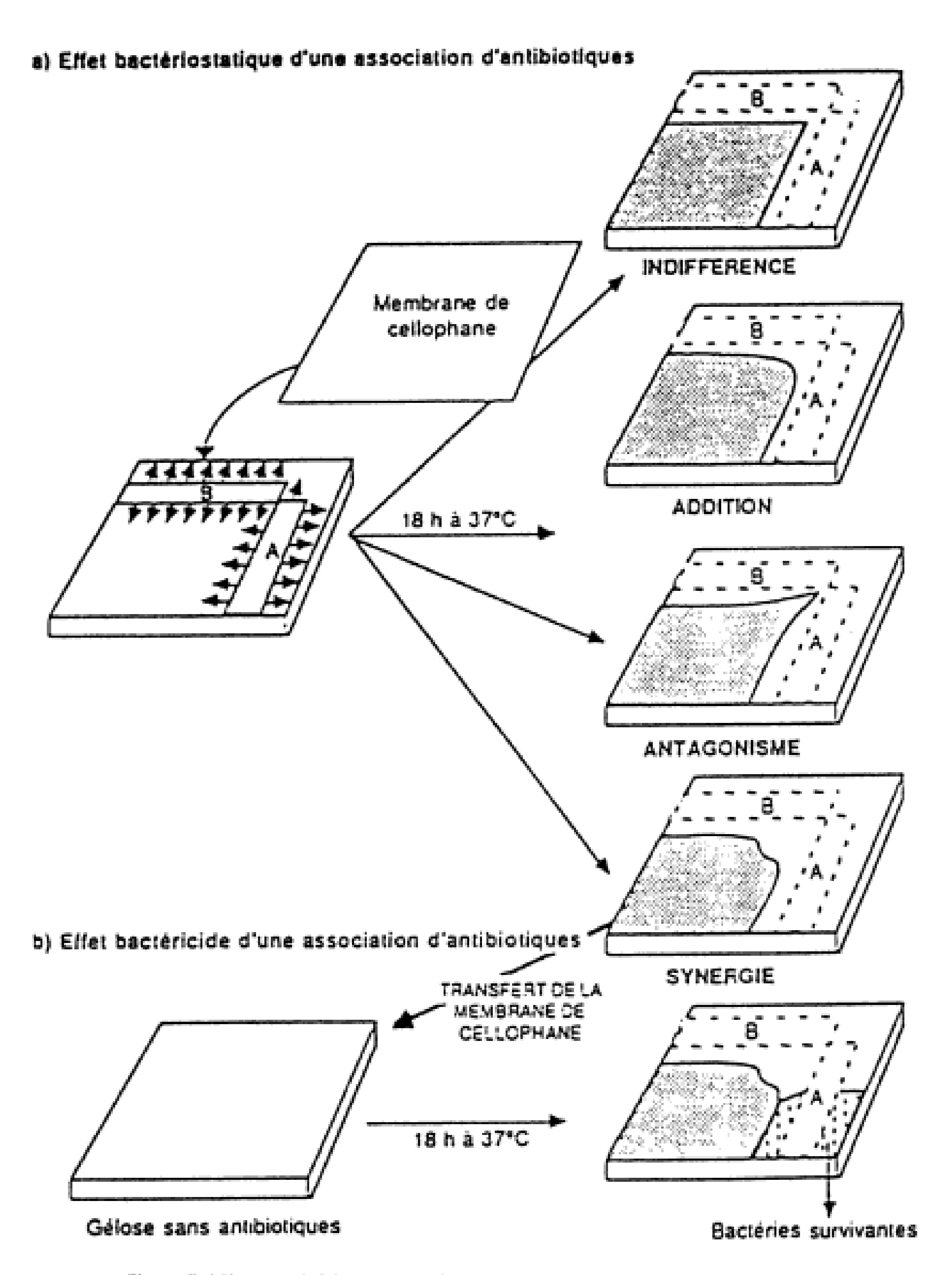


Figure 7. Mise en évidence de l'interaction entre deux antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé

tion, on peut apprécier la croissance des bactéries survivantes dans chaque plage d'inhibition et dans la zone d'intersection.

Les techniques de diffusion sont simples et rapides à mettre en œuvre tant que l'on étudie l'effet bactériostatique des associations ; elles deviennent rapidement lourdes et délicates pour l'étude de l'effet bactéricide. Enfin, l'interprétation est purement qualitative et difficilement reliable aux concentrations d'antibiotiques *in vivo*.

b) Mesures quantitatives en milieu liquide

• Le schéma triangulaire

Cette technique, utilisée en bactériologie médicale, consiste à distribuer une suspension de germes (10^6 germes/mL) en croissance exponentielle dans une série de tubes disposés selon un modèle triangulaire.

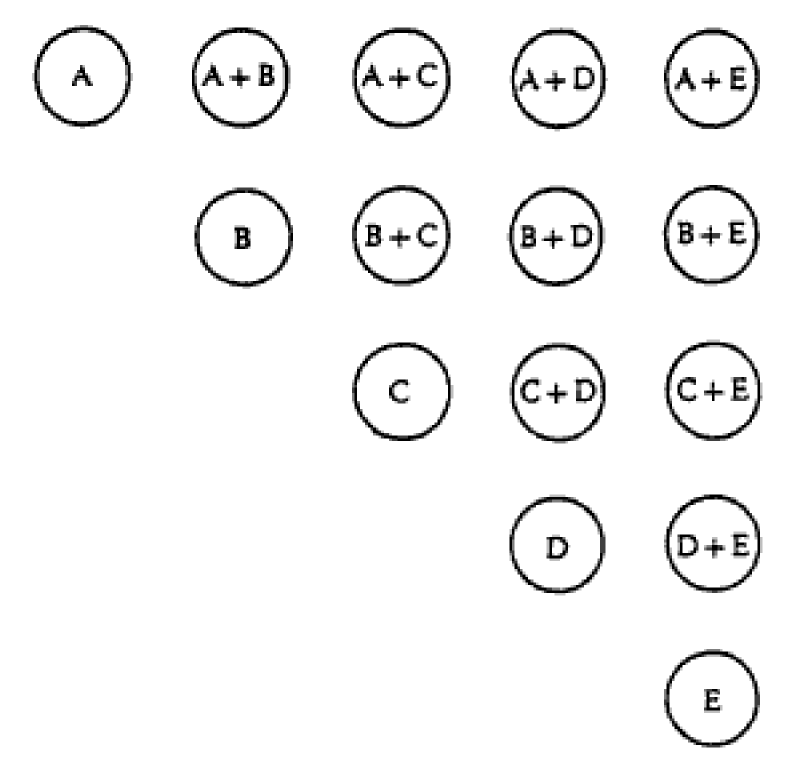


Figure 8. Schéma triangulaire pour l'étude des associations d'antibiotiques

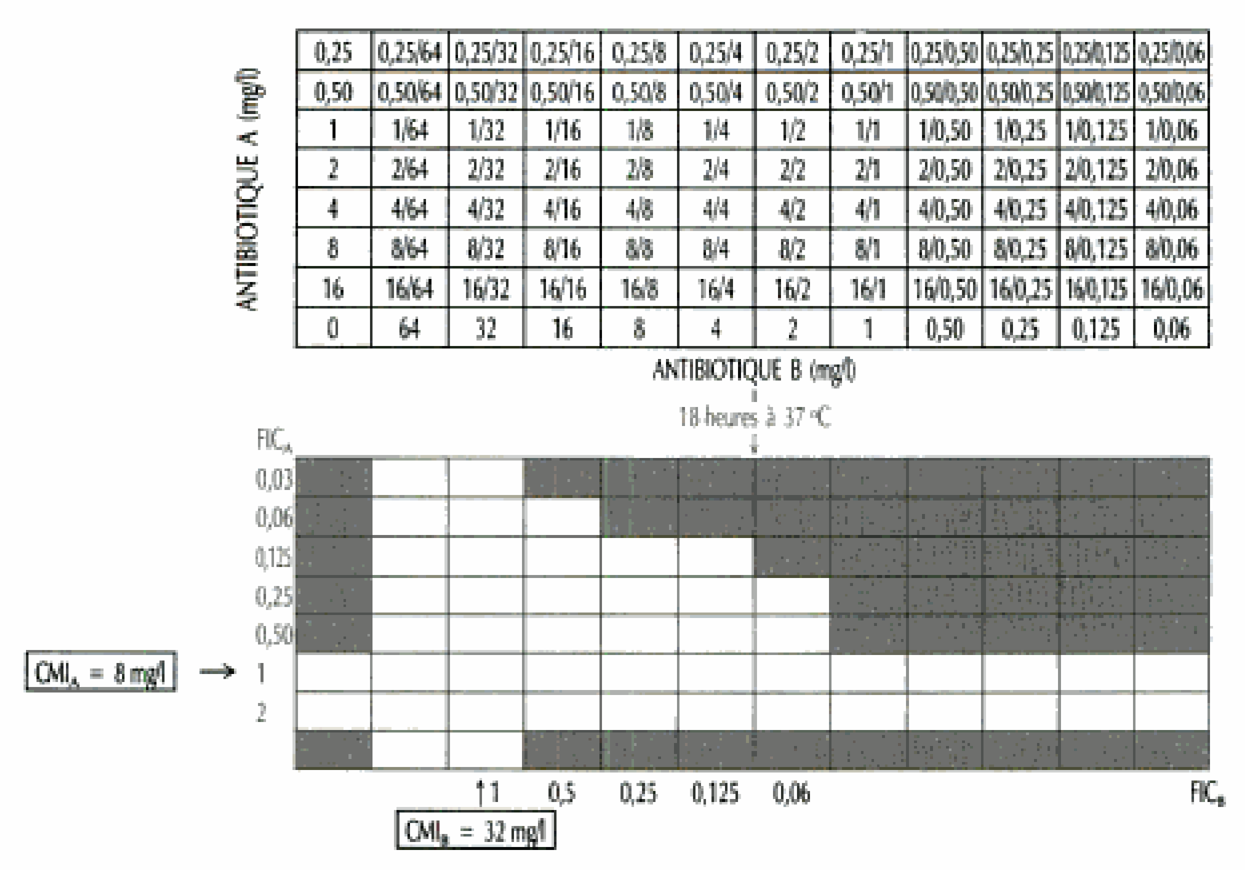
Chacun d'eux contient une concentration d'antibiotique (disques pour antibiogramme ou solution d'antibiotique) correspondant au taux sérique habituellement atteint ; les antibiotiques sont utilisés seuls ou en association deux par deux. Après 18 heures d'incubation à 37 °C, la numération des germes survivants de chaque tube permet de déterminer l'effet bactéricide (défini par un taux de survivants inférieur ou égal à 0,01 %) des antibiotiques ou de leurs associations.

Cette étude est rapide et facile d'exécution mais ne permet en général l'étude que d'une seule concentration d'antibiotique.

• La méthode de l'échiquier ou schéma carré

La méthode de l'échiquier consiste à réaliser, dans des plaques de microtitration (ou en tubes), une gamme de concentration d'un antibiotique A avec une gamme de concentration d'un antibiotique B, que l'on incube en présence d'une suspension bactérienne (10^6 bactéries/mL) pendant 18 heures à 37 °C. On note alors, pour chaque rangée, le premier puits contenant les antibiotiques A et B où la croissance bactérienne est inhibée (*bactériostase*).

Pour chacun de ces puits, on détermine la fraction inhibitrice de l'antibiotique A (FICA), l'index FICA étant défini comme le rapport de la CMI du premier antibiotique A en présence de B sur la CMI de A seul, et l'index FICB (CMI de B en présence de A sur CMI de B seul). Ces résultats de *bactériostase* sont reportés sur un graphique ayant pour abscisse l'index FICB, et pour ordonnée l'index FICA.



0,25	0,25/64	0,25/32	0,25/16	0,25/8	0,25/4	0,25/2	0,25/1	0,25/0,50	0,25/0,25	0,25/0,125	0,25/0,06
0,50	0,50/64	0,50/32	0,50/16	0,50/8	0,50/4	0,50/2	0,50/1	0,50/0,50	0,50/0,25	0,50/0,125	0,50/0,06
1	1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	1/1	1/0,50	1/0,25	1/0,125	1/0,06
2	2/64	2/32	2/16	2/8	2/4	2/2	2/1	2/0,50	2/0,25	2/0,125	2/0,06
4	4/64	4/32	4/16	4/8	4/4	4/2	4/1	4/0,50	4/0,25	4/0,125	4/0,06
8	8/64	8/32	8/16	8/8	8/4	8/2	8/1	8/0,50	8/0,25	8/0,125	8/0,06
16	16/64	16/32	16/16	16/8	16/4	16/2	16/1	16/0,50	16/0,25	16/0,125	16/0,06
0	64	32	16	8	4	2	1	0,50	0,25	0,125	0,06

Figure 9a. Technique de l'échiquier pour la détermination de la bactériostase et de la bactéricidie des associations d'antibiotiques

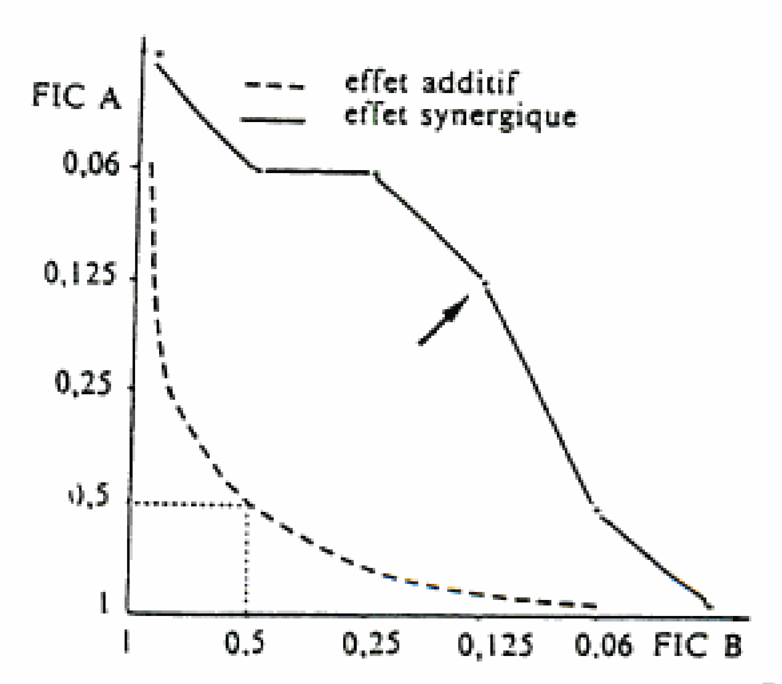


Figure 9b. Représentation à l'aide d'isobologramme des index FIC

Le profil de la courbe (appelée *isobologramme*) est différent selon que l'effet de l'association est synergique (aspect concave) ou antagoniste (aspect convexe). La valeur de l'association est quantifiée par :

FIC = FICA + FICB

L'addition correspond à un FIC = 1, l'antagonisme à un FIC > 2, la synergie à un FIC < 0,75 et l'indifférence à un FIC compris entre 1 et 2.

Les résultats de *bactéricidie* sont interprétés en fonction de la numération des survivants dans les puits (ou tubes) ne présentant pas de croissance visible à l'œil nu. À l'inverse de l'effet bactériostatique, la bactéricidie n'est généralement pas proportionnelle à la concentration de l'antibiotique, et le nombre de survivants peut demeurer stable pour une large gamme de concentrations. Il est donc le plus souvent impossible de définir l'interaction de deux antibiotiques en fractions de concentrations actives et de calculer un index comme dans le cas précédent.
On peut néanmoins interpréter ces interactions de la façon suivante : dans la synergie, l'effet de l'association est supérieur à celui de l'antibiotique le plus efficace (différence > 10^2 bactéries/mL). Il y a indifférence ou addition si l'effet de l'association est comparable à celui de l'antibiotique le plus efficace, et il y a antagonisme si l'association est moins active que le plus efficace des antibiotiques.

• Cinétique de bactéricidie des associations d'antibiotiques

C'est une variante de la méthode précédente qui associe l'échiquier et l'étude de la cinétique de bactéricidie en numérant à différents temps les bactéries survivantes dans chaque tube. Les courbes de croissance obtenues permettent :
- de mesurer la vitesse de bactéricidie d'une association, critère qui doit être pris en compte lors du choix du traitement d'une infection grave ;
- d'apprécier la cinétique des effets observés, notamment les phénomènes liés à la recroissance bactérienne.

T = témoin sans antibiotique A ou B
A, B, A + B = courbes en présence de A, B, A + B

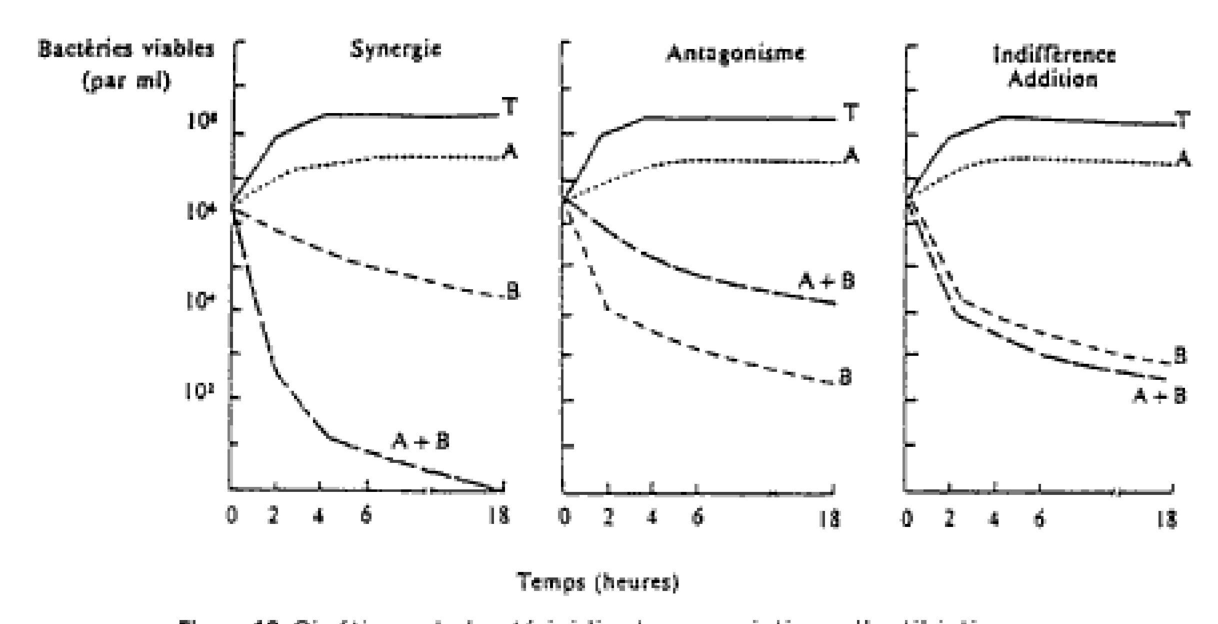


Figure 10. Cinétique de bactéricidie des associations d'antibiotiques : exemple de résultats et interprétation

Cette méthode surmonte certaines insuffisances des protocoles précédents : ainsi pour l'association de deux antibiotiques dont les CMB sont identiques, une différence majeure peut être individualisée concernant la cinétique de l'effet bactéricide.

E. Étude de l'activité antibactérienne *in vivo*, pouvoir bactéricide du sérum (PBS)

Cet examen a pour objectif de vérifier que le sérum (ou le LCR) d'un patient recevant des antibiotiques a un effet bactéricide sur le germe responsable de l'infection. La nécessité d'un traitement bactéricide n'a été démontrée que dans les endocardites bactériennes, les méningites et les septicémies à bacilles à Gram négatif chez le malade granulopénique.

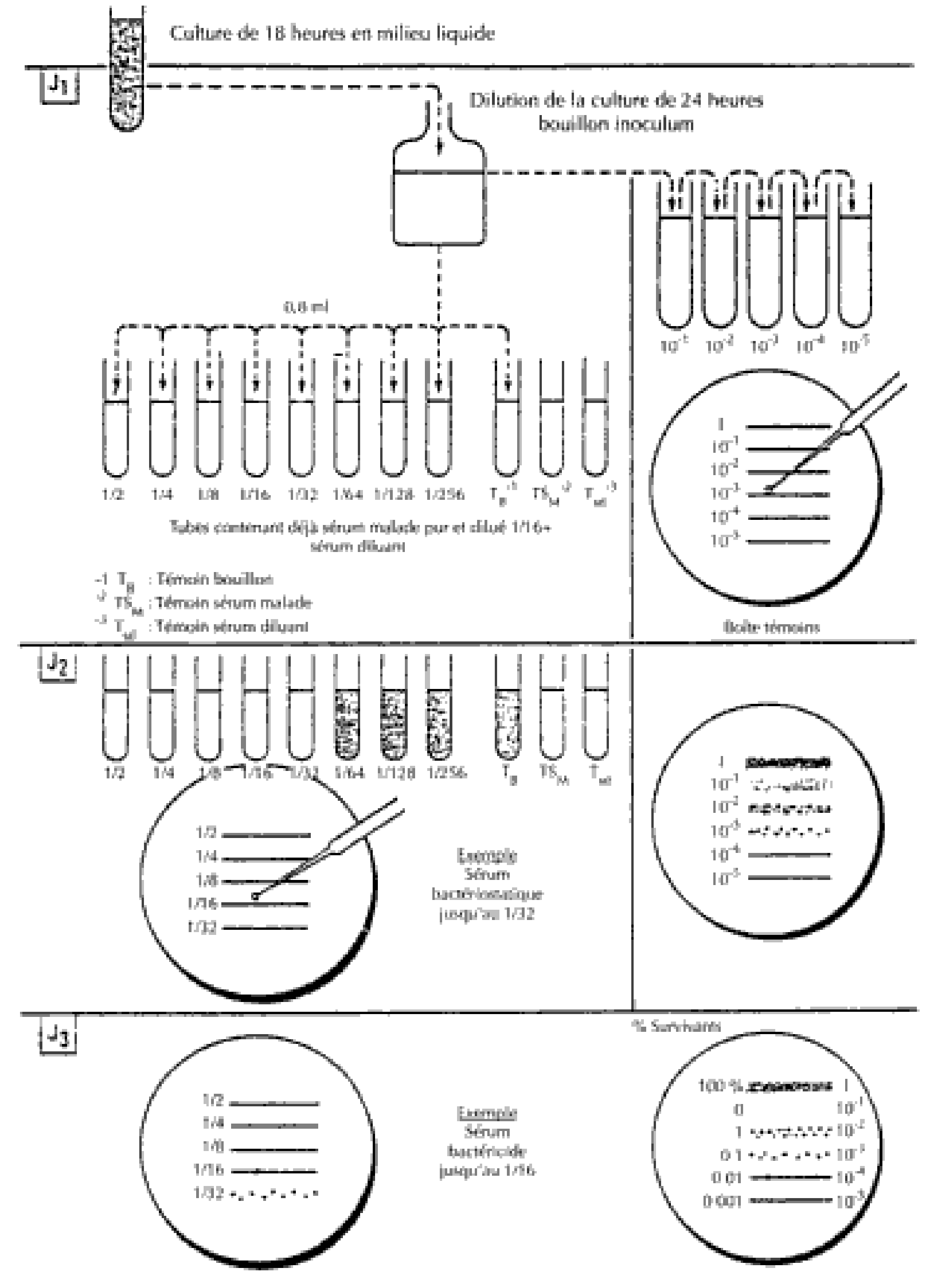


Figure 11. Réalisation pratique d'un pouvoir bactéricide du sérum

En pratique, les prélèvements sanguins doivent être effectués en tenant compte de la pharmacocinétique des antibiotiques. Deux prélèvements sont nécessaires : le

premier au plus bas des concentrations sériques d'antibiotiques (vallée), c'est-à-dire avant une nouvelle injection, le second au maximum des concentrations sériques (pic), c'est-à-dire après 45 minutes pour une injection IM, 15 minutes pour une injection IV ou une perfusion.
Cette technique est le plus souvent réalisée en tube mais peut l'être également en microméthode. On détermine la bactériostase en évaluant la dilution maximale du sérum capable d'inhiber la croissance des germes (inoculum 10^6 germes/mL) après 18 heures d'incubation à 37 °C. Dans un second temps, on détermine le pouvoir bactéricide du sérum en dénombrant les survivants dans tous les tubes où aucune croissance bactérienne n'est visible.
Une variante consiste à étudier la cinétique de bactéricidie en repiquant tous les tubes après 2, 4 et 6 heures d'incubation et en traçant une courbe de bactéricidie du sérum. Cette étude cinétique permet de prendre en considération les phénomènes de recroissance bactérienne et également l'instabilité de certains antibiotiques. L'interprétation de la bactéricidie est variable selon que les critères de bactéricidie adoptés sont 0,01 ou 0,1 % de survivants.
On considère qu'un pouvoir bactéricide du sérum supérieur à 1/32 permet d'affirmer que le clinicien s'est placé dans les meilleures conditions pour traiter une infection grave mais ne permet pas de prédire une évolution favorable de l'infection. À l'opposé, un pouvoir bactéricide du sérum inférieur à 1/8 est statistiquement corrélé avec une évolution défavorable.

Conclusion

Exception faite des cas où il est possible de traiter une infection sans faire l'antibiogramme, mais seulement sur des données épidémiologiques permettant de suspecter la bactérie responsable, et à condition que la résistance de cette espèce évolue peu, il est en général indispensable de tester la sensibilité du germe responsable de l'infection. Le bactériologiste a à sa disposition tout un arsenal technique, allant du plus simple (antibiogramme) au plus délicat, lui permettant de déterminer *in vitro* l'activité bactériostatique ou bactéricide d'un antibiotique ou d'une association vis-à-vis du germe étudié.
Néanmoins, des discordances entre les tests *in vitro* et la réponse au traitement existent ; elles tiennent :
- soit au malade (diminution des facteurs de résistance de l'hôte, mauvaise compliance au traitement) ;
- soit au type d'infection (foyer infectieux profond, surinfection par un autre agent infectieux, infection plurimicrobienne…) ;
- soit à l'antibiothérapie elle-même (posologie insuffisante, sélection de mutant résistant, concentration insuffisante au niveau du foyer infectieux) ;
- soit à l'état physiologique de la bactérie au niveau du foyer infectieux.

L'essentiel de la question

Une souche bactérienne isolée ponctuellement dans un prélèvement pathologique peut être *sensible* (S), *intermédiaire* (I) ou *résistante* (R) à un antibiotique donné. La *catégorisation clinique* de la souche se fait par la réalisation de l'*antibiogramme* standard. L'antibiogramme standard est une approche de la détermination des *concentrations minimales inhibitrices* (CMI) du germe à différents antibiotiques.
En France, l'antibiogramme est le plus souvent réalisé par la méthode de *diffusion en milieu gélosé* selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CASFM).
L'interprétation se fait en fonction des *diamètres d'inhibition* observés autour des disques d'antibiotiques correspondant à des *concentrations critiques.* Les valeurs et diamètres critiques qui délimitent les catégories S, I et R résultent de l'intégration de nombreuses données : distribution des CMI pour des populations de souches sensibles et résistantes de l'espèce bactérienne, concentrations tissulaire et humorale de l'antibiotique habituellement obtenues avec les posologies recommandées, confrontation des résultats *in vitro* avec les résultats cliniques, variabilité des méthodes statistiques utilisées.
L'antibiogramme peut être également réalisé *en milieu liquide par des méthodes automatisées.* Il est parfois nécessaire de déterminer précisément les concentrations minimales inhibitrices d'un germe à un antibiotique avec la méthode par dilution en milieu gélosé, ou par la méthode du E-test. Cette dernière, bien que coûteuse, est rapide et pratique.
Dans certaines circonstances (endocardites bactériennes, méningites ou septicémies bactériennes du patient granulopénique), il est possible d'étudier l'activité bactéricide du sérum (ou du LCR) *in vivo.* Selon les pays, on considère que le sérum ou le LCR est bactéricide s'il existe moins de 0,1 % ou 0,01 % de survivants.
L'interprétation d'un pouvoir bactéricide du sérum ou d'un LCR est délicate car la prédictivité de cet examen dans l'évolution clinique n'est pas formellement établie.
Pour permettre au clinicien de connaître les indications bactériologiques précises d'un antibiotique, les espèces bactériennes sont classées en trois catégories : espèces habituellement sensibles à un antibiotique (moins de 10 % des souches résistantes), espèces modérément sensibles (plus de 90 % des souches sont classées dans la catégorie intermédiaire), espèces résistantes (plus de 50 % des souches sont résistantes).

Pour en savoir plus

- Berche P. *et al. Bactériologie : bactéries des infections humaines.* Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, 1988.
- Carbonnelle B. *et al. Bactériologie médicale : techniques usuelles.* SIMEP, Paris, 1987.
- Courvalin P. *et al. Bactéricidie, aspects théoriques et thérapeutiques.* Maloine, Paris, 1990.
- Courvalin P. *et al. L'antibiogramme.* MPC Videom, Paris, 1985.
- Le Minor L., Veron M. *Bactériologie médicale.* Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, 1989.
- Briand M. *Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques.* Masson, Paris, 1986.
- Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. *Précis de bactériologie clinique.* ESKA, Paris, 2000.



Virologie

Infections virales hépatiques

C. BOSGIRAUD, Laboratoire de microbiologie UFR de pharmacie, Limoges.

Les hépatites sont des maladies inflammatoires du foie qui se traduisent par des signes cliniques et biologiques.

L'origine d'une hépatite peut être :

- *virale, 95 % des cas ;*
- *médicamenteuse et toxicologique, 4 % des cas ;*
- *bactérienne, 1 % des cas.*

Les hépatites virales sont donc les plus fréquentes. Les virus des hépatites sont le virus de l'hépatite A ou VHA, le VHB, le VHC, le VHD, le VHE et les plus récemment découverts sont les virus GB et le virus TT.

Tableau 1. Principales caractéristiques des virus des hépatites virales

Virus	A	E	B	D	C
Découverte	1973	1990	1963	1976	1989
Famille **Genre**	Picornaviridae *Hepatovirus*	*Hepatitis E like* virus	*Hepadnaviridae* *Orthohepadna-virus*	Deltavirus	*Flaviviridae* *Hepacivirus*
Génome	ARN+	ARN+	ADN bicaténaire	ARN	ARN+
Répartition	Mondiale	Pays en développement	Mondiale	Foyers rares	Mondiale
Transmission **Oro-fécale** **Parentérale** **Sexuelle** **Mère/enfant**	 +++ Très rare Très rare 0	 +++ ? Très rare ?	 0 +++ +++ ++	 0 +++ ++ +/	 0 +++ Rare + surtout si co-infection VIH
Clinique **Incubation** **Chronicité** **Cancer** **Hépatite fulminante**	 15 à 50 J 0 0 Rare	 15 à 90 J 0 0 Risque > femme enceinte	 30 à 120 J + + +	 21 à 90 J + + +	 35 à 84 J ++ + +/
Prévention	Hygiène Vaccin	Hygiène	Hygiène Ig anti-HBs Vaccin	Hygiène Vaccin anti-HBV	Hygiène

Sont classiquement exclus de cette liste d'autres virus occasionnellement hépatotropes comme :

- *le cytomégalovirus (CMV), le virus Epstein-Barr (EBV) et d'autres virus du groupe Herpes ;*
- *des adénovirus, des entérovirus, le virus de la rubéole chez le nouveau-né et des virus des fièvres hémorragiques (Ebola, Lassa, Marburg).*

I. Notions fondamentales

Les hépatites virales représentent un réel problème de santé publique du fait de leur possible évolution, pour certaines d'entre elles, vers la cirrhose et l'hépatocarcinome.
Ces virus sont généralement non cultivables ou très difficiles à isoler en cultures cellulaires.
Ils appartiennent à des familles différentes. Ce sont des virus à ARN, sauf le VHB à ADN partiellement bicaténaire.
Le mode de transmission diffère : il est soit entéral (VHA et VHE), soit parentéral et sexuel (VHB, VHD et VHC). La transmission mère/enfant est possible pour les VHB et VHC.
Les formes paucisymptomatiques ou asymptomatiques sont les plus fréquentes.

Lorsqu'elles sont symptomatiques, les hépatites virales peuvent se présenter :

- sous forme d'une hépatite aiguë évoluant soit vers la guérison, soit vers la chronicité ;
- sous forme d'une hépatite fulminante ;
- sous forme d'une hépatite chronique.

Toutes les hépatites symptomatiques se manifestent par un ensemble de signes cliniques semblables qui ne permettent pas de les différencier cliniquement, excepté l'évolution possible vers la chronicité.
Il n'y a pas d'immunité croisée entre les différentes hépatites.
Seuls les diagnostics biologiques et virologiques permettront de différencier les hépatites entre elles par des tests spécifiques accessibles aux laboratoires de biologie.
Actuellement, seules les hépatites A et B peuvent être prévenues par la vaccination.
Il existe également des thérapeutiques antivirales efficaces contre les hépatites chroniques B et C.

II. Manifestations cliniques communes

Les différentes évolutions pathologiques possibles sont l'hépatite aiguë, l'hépatite fulminante, l'hépatite chronique, la cirrhose et l'hépatocarcinome.

A. L'hépatite aiguë

La durée d'incubation est variable selon le virus, sans signes cliniques.

1. Phase préictérique

- La durée varie entre 3 et 15 jours.
- Des signes prodromiques généraux : asthénie, fébricule, céphalée et parfois un rash cutané et des arthralgies.

2. Phase ictérique

- Urines foncées (café).
- Selles décolorées (mastic).
- Coloration de la peau variable (jaunisse).
- Troubles digestifs, asthénie.
- Hépatomégalie, parfois splénomégalie.
- Signes biologiques non spécifiques mais très nets.
- L'évolution se fait en règle vers la guérison.

3. Autres formes

- Anictérique.
- Cholestatique.
- Formes à manifestations extrahépatiques (digestives, thoraciques, neurologiques, hématologiques) ou liées à la présence d'immuns-complexes circulants.
- Formes prolongées évoluant vers la guérison.

B. L'hépatite fulminante

Aux signes d'hépatite aiguë s'ajoutent une encéphalopathie et souvent des hémorragies cutanéo-muqueuses et viscérales. Il y a une nécrose aiguë et massive du foie. Le pronostic est sévère.

C. Les hépatites chroniques

Elles sont induites par les virus HB, HD et HC.
Elles sont classées sur des critères anatomopathologiques et histopathologiques après biopsie du foie : selon le score de Knodell ou la classification Métavir.

1. L'hépatite chronique persistante

Survenant souvent après une hépatite aiguë, l'hépatite chronique persistante est soit asymptomatique, soit se prolonge avec des signes d'asthénie, d'hépatalgie et des troubles digestifs fonctionnels. L'hypertransaminasémie est modérée ; il n'y a pas de fibrose hépatique, les espaces portes sont inflammatoires. L'évolution spontanée est généralement favorable.

2. L'hépatite chronique active

Les signes cliniques sont ceux d'insuffisance hépatocellulaire, avec des hémorragies digestives et une asthénie importante En plus de l'état inflammatoire, on note une nécrose hépatocytaire et une fibrose plus ou moins importante. Les suivis biologiques et des marqueurs viraux sont prédictifs de l'évolution. Mais le pronostic est sombre.
L'hépatite chronique évolutive à VHB et VHC prédispose à l'évolution vers une cirrhose et/ou un hépatocarcinome.

III. Diagnostic biologique

Il est dominé par deux notions :
- le *diagnostic biochimique n'est pas spécifique*, l'atteinte de la cellule hépatique se traduit par une série de signes qui indiquent simplement qu'il y a hépatite ;
- le *diagnostic virologique direct et indirect apporte le diagnostic de précision* en spécifiant l'identité du virus causal.

A. Diagnostic biochimique

De nombreux signes biochimiques sont mis en évidence. Ils traduisent l'atteinte de l'hépatocyte.

1. Signes biochimiques de cytolyse

Elle provoque une libération de substances qui sont normalement stockées dans le cytoplasme de la cellule hépatique :
- des enzymes cellulaires ;
- la vitamine B12 ;
- le fer sérique.

a) Les enzymes cellulaires

Les transaminases ou aminotransférases :
- la TGP (transaminase glutamique pyruvique) ou Alat (alanine aminotransférase cytoplasmique) est présente dans le foie et les reins ;
- la TGO (transaminase glutamique oxalacétique) ou Asat (aspartate aminotransférase) possède 2 iso-enzymes, l'une est cytoplasmique, l'autre est mitochondriale. Elle est présente dans le myocarde, les globules rouges, les muscles, les reins et le pancréas.

Leur augmentation est précoce dès la phase préictérique. Elles augmentent de 5 à 15 fois. Cela n'a pas une valeur pronostique. Dans les hépatites chroniques, leur augmentation peut persister à des taux modérés.
Leur augmentation ultérieure est un signe de rechute.
Elles s'effondrent dans la phase terminale de l'hépatite fulminante.
L'ornithine carbamyltransférase (OCT) possède une très grande spécificité hépatique mais se révèle trop sensible car elle augmente devant toute agression de la cellule hépatique.
Les lacticodéshydrogénases (LDH) :
- le dosage des LDH totales n'est pas spécifique ;
- la séparation électrophorétique des iso-enzymes révèle une augmentation de la fraction 5 spécifique du foie, mais son dosage doit être rapide car cette fraction est très labile.

b) La vitamine B12

Le foie étant le réservoir naturel de la vitamine B12, toute lésion entraîne une hypervitaminémie mais son dosage est difficile.

c) Le fer sérique

Il est augmenté dans les hépatites aiguës. Cette augmentation est plus tardive que celle des transaminases. Le maximum est situé vers la 2[e] semaine et une décroissance s'effectue jusqu'à la 7[e] et la 8[e] semaine. Valeurs moyennes : 35 et 45 µmol/L.

2. Signes biochimiques de rétention biliaire

La cholestase hépatique entraîne une augmentation moyenne de la bilirubine dès les premières semaines (85 % de bilirubine conjuguée). Présence d'urobiline dans les urines.

3. Signes biochimiques d'insuffisance hépatique

- Discrète dans les hépatites aiguës, importante dans les hépatites graves et fulminantes.
- Protéines sériques totales : pas de changement.
- Cholestérol total : non modifié, estérifié : diminué.
- Facteurs de coagulation :
  - diminution du TP : ≈ 70 % (si < 65 % : hospitalisation) ;
  - diminution du facteur V.

4. Signes biochimiques dus à la réponse immunitaire

Hypergammaglobulinémie (25 g/L) dans 90 % des cas dans la première semaine de l'ictère ; cette hypergammaglobulinémie disparaît tardivement entre la 6[e] et la 8[e] semaine.
Augmentation des IgG et des IgM.
En conclusion, c'est la très forte augmentation des transaminases qui est le test le plus fiable.

B. Diagnostic biologique spécifique

Il repose sur la mise en évidence du virus, de ses antigènes ou du génome, par diverses techniques. La sérologie permet de mettre en évidence la réponse immunologique spécifique de l'infection virale.
La ponction biopsie hépatique peut être nécessaire en cas d'hépatite chronique, de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire, notamment lors de l'infection par le VHC. Les lésions anatomopathologiques observées sont évaluées selon un inventaire lésionnel précis en quantifiant les lésions nécro-inflammatoires et la fibrose ; deux tests ont pour cela été utilisés, les scores de Knodell et Métavir.
Aujourd'hui, le score Métavir est seul utilisé.
Des marqueurs biologiques (acide hyaluronique) peuvent permettre une évaluation non invasive de la fibrose hépatique. Des scores associant plusieurs marqueurs permettent d'améliorer leur fiabilité.

IV. Hépatite à virus A (VHA)

A. Épidémiologie

Connue depuis des siècles, l'hépatite A est une infection cosmopolite. On estime à 10 millions le nombre de cas par an recensés dans le monde. C'est la plus fréquente des hépatites aiguës dans les pays industrialisés où son épidémiologie est en pleine évolution du fait de l'amélioration des conditions sanitaires en matière d'assainissement, et de l'existence d'une vaccination efficace depuis 1992.

Dans les pays en développement où l'hépatite A est endémosporadique, l'infection est quasi inéluctable dans la petite enfance avec une séroprévalence élevée. Les populations des pays industrialisés sont de plus en plus réceptives au VHA car de moins en moins exposées aux contaminations naturelles (voyageurs, professions dans les collectivités).

On distingue quatre types de régions :

- les zones de haute endémicité : Afrique, Asie, Océanie, Amérique centrale ;
- les zones d'endémicité intermédiaire : disséminées dans toutes les parties du monde (pourtour méditerranéen, Amérique du Sud, Mexique, Cuba, Chine) ;
- zones d'endémicité modérée : Europe de l'Ouest, Amérique du Nord, Australie ;
- zones de faible endémicité : pays scandinaves, Japon.

B. Transmission

Le principal réservoir de virus est l'homme ; il est peu réceptif aux génotypes simiens.

Le VHA est essentiellement transmis par voie *oro-fécale*, par contact direct de personne à personne par les mains sales.

Le virus est excrété par les selles, éliminé dans le milieu extérieur et ainsi contamine l'eau, les boues… L'excrétion fécale débute entre 4 et 6 jours avant l'apparition de l'ictère puis disparaît en 2 ou 3 semaines. Elle peut se prolonger pendant plusieurs mois chez le nourrisson. La virémie, concomitante, est maximum au cours de la phase prodromique et dure de 1 à 2 semaines.

La transmission indirecte par l'eau de consommation et les aliments (coquillages) est parfois à l'origine d'épidémie.

La transmission parentérale par le sang est possible (toxicomanes).

La transmission sexuelle peut exister (homosexuels).

C. Le virus

Le VHA est un virus à ARN monocaténaire de polarité +, non enveloppé, de 27 à 28 nm de diamètre, classé dans le genre *Hepatovirus* de la famille des *Picornaviridae*. Sa capside, icosaédrique, est formée de 32 capsomères, chacun composé de 4 protéines virales : VP1, VP2, VP3 et VP4. Il n'existe qu'un seul sérotype de VHA et qu'une seule souche vaccinale. L'infection par le VHA est très immunogène. Les IgG anti-VHA sont détectables plusieurs dizaines d'années après la guérison, témoignant d'une immunité protectrice efficace.

La plupart des souches humaines appartiennent au génotype I, et accessoirement aux génotypes II, III et VII. Les génotypes IV, V et VI sont d'origine simienne.
Le VHA est connu pour sa résistance aux agents physiques et chimiques. Ces propriétés lui confèrent une infectivité élevée et une survie prolongée dans le milieu extérieur (thermorésistance, au froid, à l'eau chlorée, à de nombreux désinfectants). Il est inactivé par chauffage 5 minutes à 100 °C, ou par le formol, la β-propiolactone et les UV.
À la différence des autres picornavirus, il se multiplie lentement en cultures cellulaires (MRC5, hépatocytes humains, cellules rénales de singe vert d'Afrique), ne provoquant pas ou peu d'effets cytopathologiques. Si la culture cellulaire n'est pas utilisée en diagnostic pour son isolement, elle a permis la mise au point du vaccin.

D. Clinique

1. L'hépatite aiguë

La période d'incubation dure entre 15 et 45 jours.
L'expression clinique de l'infection augmente avec l'âge. Plus de 90 % des enfants infectés avant l'âge de 5 ans sont asymptomatiques alors que 70 à 80 % des adultes infectés ont une symptomatologie clinique. Lors de l'infection aiguë, le taux parfois élevé des transaminases n'est pas corrélé à la sévérité de la maladie. L'évolution est généralement favorable, sans traitement. Seul le repos au lit est recommandé. L'évolution n'est jamais chronique.

2. Autres formes

Il n'existe pas de porteurs chroniques du virus A.

- L'hépatite à rechute : 3 % des formes symptomatiques. Elle se manifeste 30 à 90 jours après le premier épisode avec une réélévation des transaminases et des signes cliniques.
- Les formes cholestatiques : l'ictère fébrile est prolongé avec un prurit intense et une cholestase.
- L'hépatite fulminante : elle est exceptionnelle mais gravissime avec encéphalopathie. La surveillance du temps de Quick et du taux de facteur V est indispensable.
- Le VHA pourrait également déclencher secondairement une *hépatite auto-immune* de type I.
- Exceptionnellement, le VHA a été mis en cause dans la survenue d'*atteintes extrahépatiques* : pancréatite ou cholécystite aiguës, méningo-encéphalite, syndrome de Guillain-Barré, glomérulopathie, néphropathie interstitielle, purpura thrombopénique ou aplasie médullaire.

Le VHA ne semble pas directement cytopathologique sur l'hépatocyte. La cytolyse hépatique serait la traduction de la réponse immunitaire cytotoxique de l'hôte médiée par les lymphocytes T CD8 spécifiques, et par les cellules NK. La lyse des hépatocytes entraîne la libération des virus qui passent dans la circulation (virémie), ou sont excrétés dans les voies biliaires (élimination fécale).

E. Diagnostic

La mention d'un contexte épidémique, d'un voyage en zone endémique ou d'un contage proche est d'une grande valeur dans l'orientation diagnostique.
La recherche des paramètres biochimiques a été développée précédemment.

1. Diagnostic sérologique spécifique

Le diagnostic de certitude d'une hépatite A aiguë repose sur la mise en évidence d'IgM anti-VHA

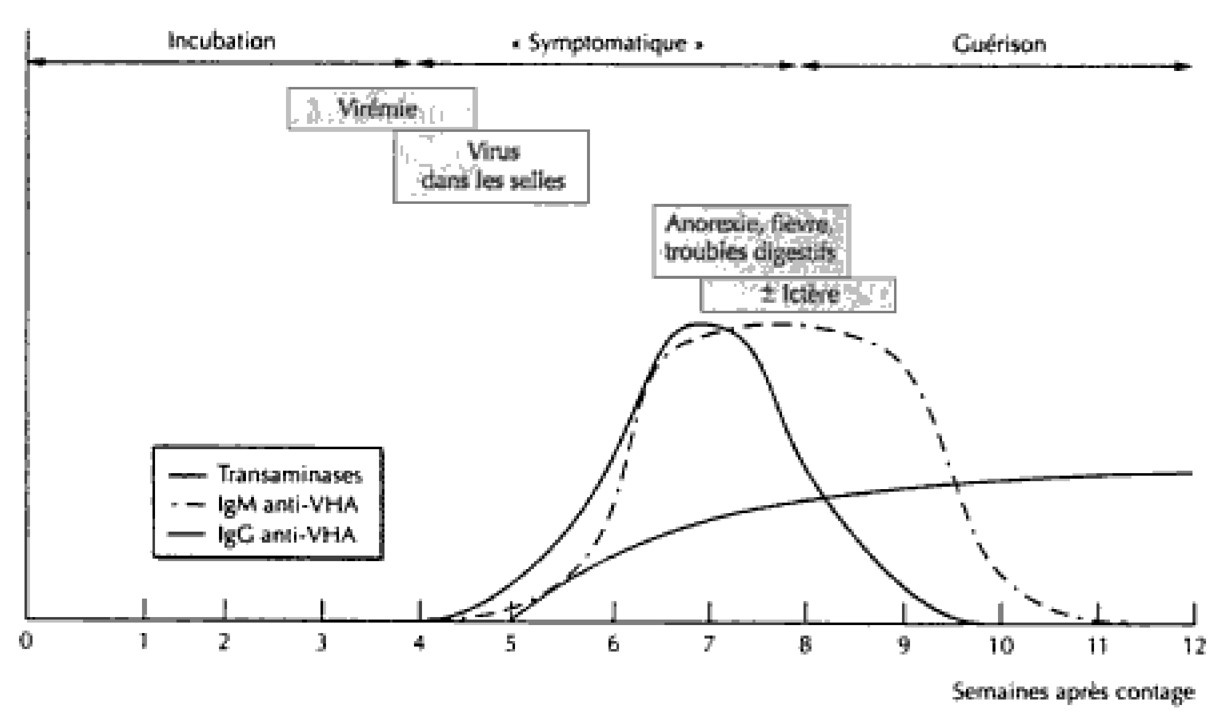


Figure 1. Représentation schématique de l'histoire naturelle de l'infection par le VHA (d'après C. DUBUISSON et M. HADCHOUEL)

dans le sérum par des techniques d'immunocapture. La technique immunoenzymatique Elisa est la plus utilisée. Les IgM apparaissent dès la phase préictérique et persistent entre 3 et 6 mois. Les IgG persistent ensuite pendant toute la vie. La détection des anti-VHA totaux par techniques immunoenzymatiques de compétition permet de connaître le statut immunitaire des individus lors d'enquêtes épidémiologiques ou de prophylaxie prévaccinale.

2. Diagnostic direct

Il est possible mais rarement réalisé en pratique courante et réservé à des laboratoires spécialisés.
La mise en évidence du virus précocement à partir des selles par microscopie électronique est peu sensible, en raison du seuil de détection élevé (10^6 particules/mL).
La recherche des antigènes viraux est possible, par technique immunoenzymatique ou par radio-immunologie, et celle du génome par hybridation ou par PCR.

V. Hépatite à virus B (VHB)

L'hépatite B est un réel problème de santé publique par sa possible évolution vers la chronicité et la cancérisation. Depuis la découverte de l'antigène Australia ou Ag HBs par Blumbert en 1970, on connaît la structure du virus responsable, le VHB et ses modes de transmission. Les connaissances sur l'épidémiologie, les différents aspects de la maladie et son diagnostic, les traitements antiviraux actuellement utilisés et le développement de vaccins efficaces ont beaucoup évolué ces dernières années.

A. Le virus VHB

Dans le groupe des virus hépatotropes actuellement connus, le VHB est le seul à ADN. C'est un *Hepadnaviridae* du genre *Orthohepadnavirus*.
Le virus complet infectieux ou *particule de Dane (fig. 2)* est un petit virus de 47 nm de diamètre, enveloppé à capside icosaédrique. Dans le sang des sujets infectés par le VHB, d'autres particules non infectieuses sont en très grand nombre et correspondent à un excès de synthèse de protéines d'enveloppes (sans capside ni génome) ayant une forme sphérique ou filamenteuse de 22 nm de diamètre. À l'intérieur de la capside, sont attachées au génome une ADN polymérase virale douée d'une activité transcriptase inverse et une protéine kinase d'origine cellulaire.

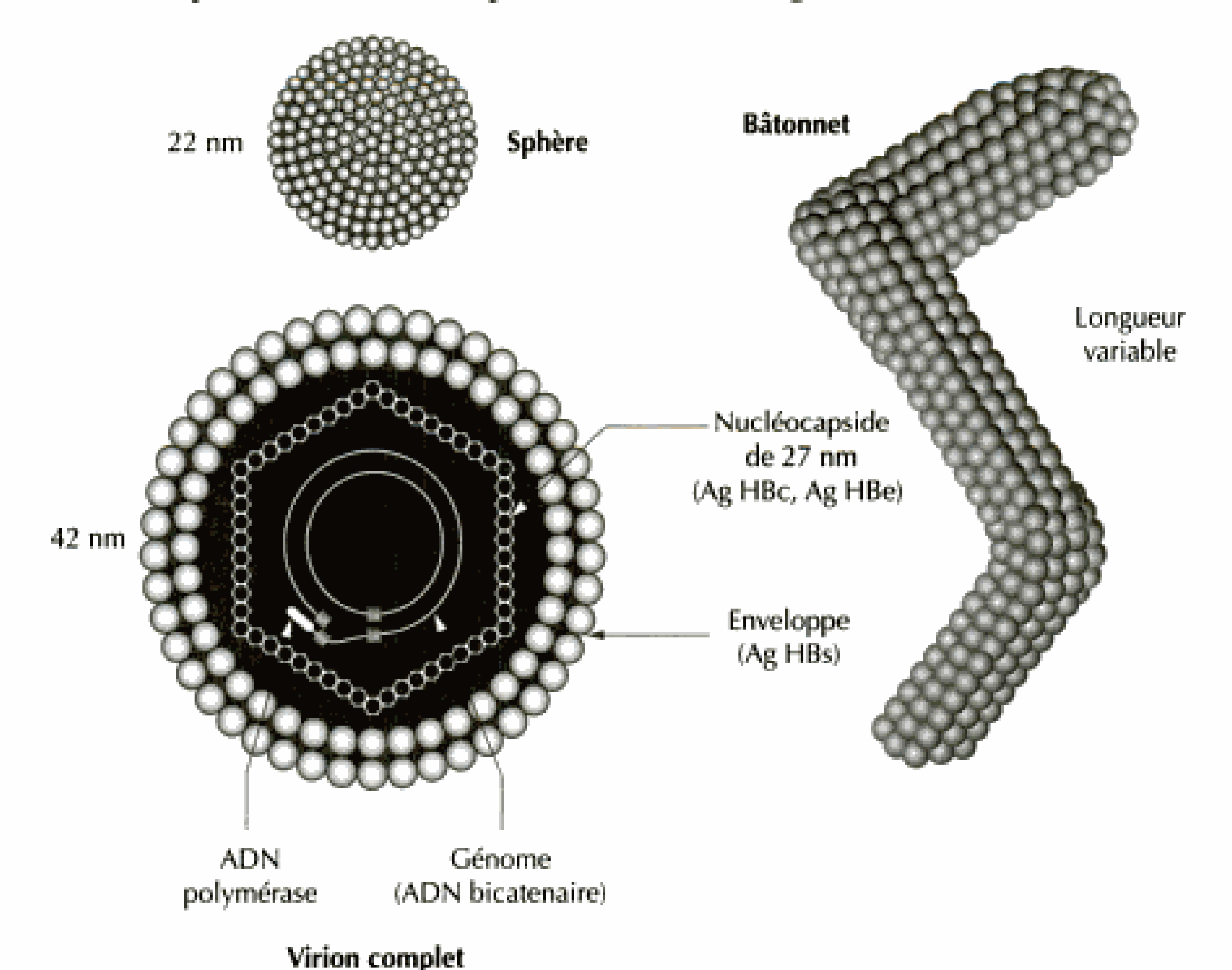


Figure 2. Le virus de l'hépatite B : particule de Dane (virion complet) et particule sphérique ou en bâtonnet correspondant à l'excès d'enveloppe (Ag HBs)

Le VHB est constitué d'un *petit génome* de 3 200 nucléotides, circulaire, partiellement double-brin constitué d'un brin long – et d'un brin court + de longueur variable (*fig. 3*). Le maintien de la forme circulaire de l'ADN est assuré par l'appariement des extrémités 5' des deux brins appelée région cohésive, au niveau des séquences DR1 (brin –) et DR2 (brin +).

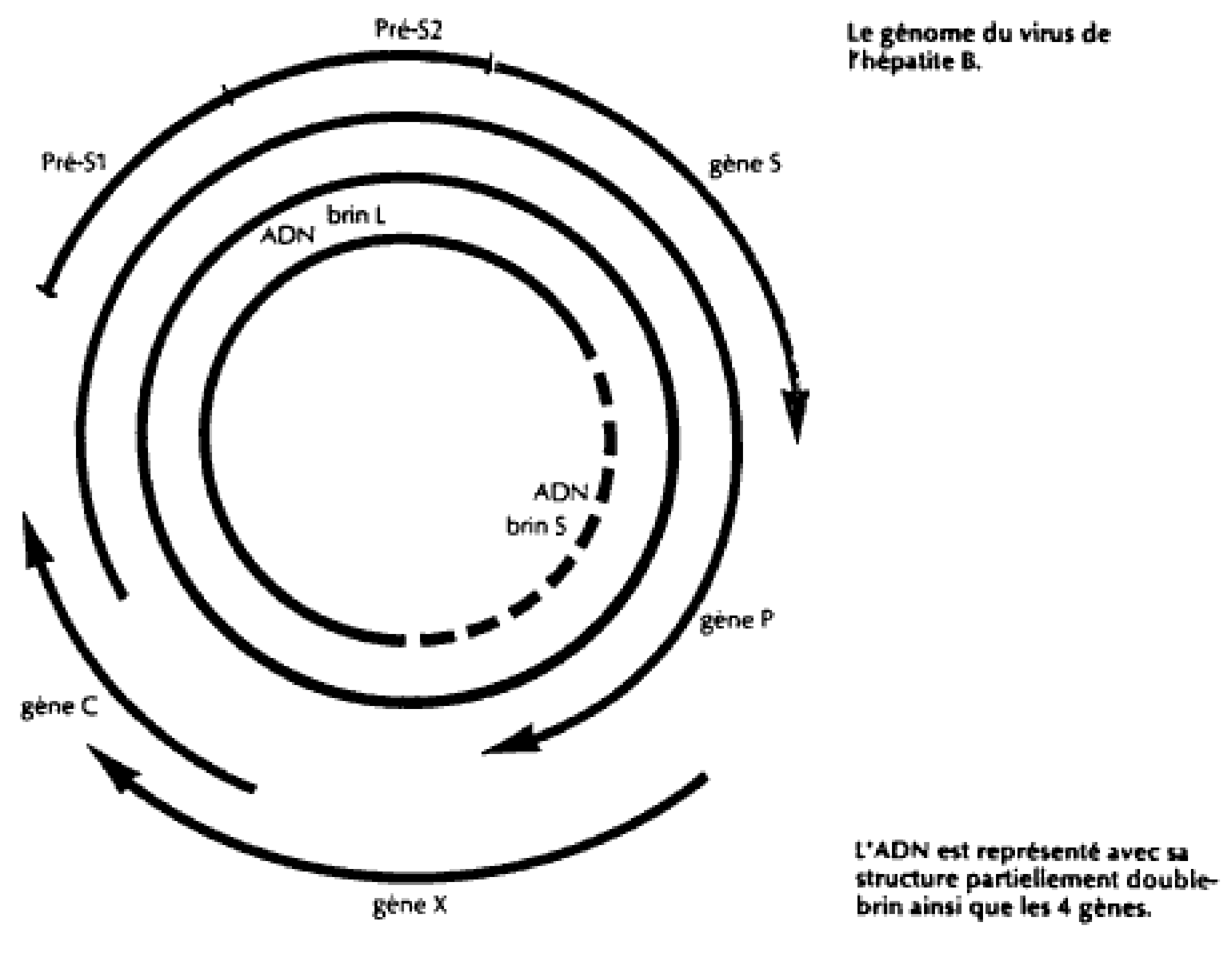


Figure 3. Le génome du VHB

Le brin – contient 4 phases de lecture ouverte ou ORF (*open reading frame*) se chevauchant dont les 4 *gènes* correspondants sont : *S*, *P*, *C* et *X*.
La région S code les 3 protéines d'enveloppe réparties dans des proportions différentes : la protéine S (*small*), majoritaire, correspond à la lecture du gène S ; ce domaine, commun aux 3 protéines d'enveloppe, correspond à l'antigénicité HBs. La protéine M (*medium*) correspond à la lecture en phase du gène pré-S2/S. La protéine L (*large*) correspond à la lecture en phase du gène pré-S1+pré-S2/S.
L'ORF C/pré-C peut coder 2 protéines. Le gène C code la protéine de nucléocapside support de l'antigénicité HBc. La lecture en phase des gènes pré-C+C code une protéine non structurale qui contient l'épitope Ag HBe, distinct de l'Ag HBc, et qui est sécrétée par la cellule infectée et circulant.
L'ORF P code pour l'ADN polymérase qui a une activité transcriptase inverse et une activité ARNseH. Enfin, l'ORF X code pour une protéine X ; ce gène semble avoir un rôle important dans la réplication virale (transcription) et l'oncogénicité du VHB.

1. Cycle de réplication

Après pénétration du virion dans la cellule, l'ADN libéré de la capside est importé dans le noyau où un ADN polymérase cellulaire le transforme en une forme super-enroulée totalement bicaténaire. Cet ADN super-enroulé sert de matrice pour la transcription par une ARN polymérase cellulaire des ARNm et de l'ARN prégénomique. La persistance de l'ADN super-enroulé dans la cellule infectée semble jouer un rôle important dans la chronicité des infections.
Trois ARNm servent à la synthèse des protéines d'enveloppes et de la protéine X. L'ARN prégénomique sert également d'ARNm pour la synthèse de la capside, de l'Ag Hbe et de l'ADN polymérase.
L'ARN prégénomique et l'ADN polymérase sont encapsidés dans le cytoplasme. Cet ARN prégénomique sert alors de matrice au processus de transcription inverse, grâce à l'ADN polymérase virale, donnant un brin d'ADN–, puis le brin d'ADN+ ; l'ADN se circularise et devient bicaténaire.
Le virion se forme par bourgeonnement de la nucléocapside à travers la membrane d'un compartiment golgien contenant les protéines d'enveloppes. Le bourgeonnement a pour effet de stopper l'élongation du brin +, ce qui explique le caractère partiellement bicaténaire du génome viral avec un brin + de longueur variable.
Le mécanisme d'intégration par lequel l'ADN du VHB est incorporé dans la cellule hôte est mal connu car le VHB ne produit pas la machinerie nécessaire à cette intégration, contrairement à un rétrovirus. L'ADN viral intégré est fortement remanié avec perte de l'expression de certains de ses gènes. Des altérations de l'ADN de la cellule accompagneraient cette intégration.
Le phénomène d'intégration du génome du VHB pourrait survenir très tôt au cours de l'infection par ce virus.

2. La variabilité génomique du VHB

Plusieurs génotypes de VHB rendent compte d'une variabilité épidémiologique, histologique, et de réponse aux antiviraux. L'hétérogénéité de l'Ag HBs a permis d'identifier 9 sous-types ou génotypes dont l'intérêt est uniquement épidémiologique.
De nombreuses mutations spontanées sont observées dans toutes les régions du génome, notamment pré-S1, S et pré-C. La région de l'enveloppe est la cible de la réponse immunitaire. Des mutations de l'Ag HBs donnent lieu à des mutants d'échappement observés chez des enfants vaccinés qui ont développé une infection car ces mutants ne sont pas neutralisés par les anti-HBs vaccinaux (mutation du déterminant « a » de l'Ag Hbs).
Des mutations ponctuelles dans le gène pré-C empêchent la transcription de l'Ag HBe. Ces souches mutantes sont surtout répandues au niveau du pourtour méditerranéen. La pathogénicité de ces mutants serait à l'origine d'une évolution plus sévère de la maladie (hépatite fulminante, évolution vers la cirrhose) et d'une mauvaise réponse à l'interféron. Ces variants pré-C échappent à la réponse immunitaire de l'hôte et sont décelés lorsque l'Ag HBe est négatif et les Ac anti-HBe sont positifs.

B. Épidémiologie et transmission

L'infection par le VHB est largement répandue dans le monde. On estime à plus de 300 millions le nombre de porteurs chroniques inégalement répartis à la surface du globe. On distingue trois régions :

- les régions de faible endémicité où moins de 2 % de la population générale a une infection chronique : Europe de l'Ouest et du Nord, Amérique du Nord ;
- les régions d'endémicité moyenne où entre 2 et 5 % de la population générale est porteuse d'une infection chronique : pourtour méditerranéen, Europe de l'Est et Amérique latine ;
- les régions de forte endémicité où entre 5 et 10 % de la population générale est porteuse chronique : Afrique, Chine, Asie du Sud-Est.

Le VHB est essentiellement présent dans le sang mais également dans des sécrétions et excrétions (sperme, salive). La virémie étant très importante, le pouvoir infectieux du virus est élevé. Un contact bref et de faibles quantités de produits infectés suffisent pour que la transmission ait lieu.

Les *différents modes de transmission* sont :

- la transmission parentérale : elle est principalement représentée par la transfusion sanguine et la toxicomanie par voie veineuse. Le dépistage obligatoire de l'Ag HBs depuis 1971 fait que le risque transfusionnel est actuellement très faible. La toxicomanie par voie IV est actuellement l'un des modes principaux de transmission du VHB, justifiant une vaccination chez ces sujets à risque ;
- la transmission sexuelle : c'est le mode de transmission le plus fréquent dans les régions de faible endémicité. Les homosexuels et hétérosexuels sont les populations les plus exposées ;
- la transmission mère/enfant : il s'agit d'un mode de transmission majeur dans les pays de forte endémicité lorsque la mère est porteuse de l'Ag HBs avec un marqueur de réplication virale (ADN ou Ag Hbe). Dans ce dernier cas, le risque pour le nouveau-né de contracter une hépatite B est compris entre 60 et 100 %. La transmission ne se fait pas in utero mais lors du passage dans la filière vaginale au cours de l'accouchement. En France, depuis 1992, le dépistage de l'Ag HBs fait partie du bilan sérologique après le 6e mois de grossesse ;
- autres : dans de nombreux cas, on ne trouve pas de cause évidente de transmission. Il pourrait s'agir d'une transmission parentérale inapparente (blessure superficielle, contact étroit interindividus, transmission nosocomiale).

C. Histoire naturelle de l'infection par le VHB

1. Hépatite aiguë

La durée d'incubation varie de 1 à 3 mois. Environ 90 % des infections aiguës sont asymptomatiques mais peuvent évoluer vers une forme chronique. Les formes aiguës avec syndrome préictérique et/ou ictérique sont peu fréquentes. Les manifestations extrahépatiques les plus fréquentes sont cutanées (urticaire) et articulaires.

Au stade d'hépatite aiguë, l'activité des aminotransférases est multipliée par 10 ou par 30. L'Ag BHs est détecté 3 semaines environ avant les signes cliniques. Sa persistance au-delà de 2 mois fait craindre le passage à la chronicité. Les IgM anti-HBc apparaissent au début de la symptomatologie et persistent pendant la phase aiguë ; les IgG sont présentes pendant la phase de guérison. L'Ag HBe apparaît peu avant l'ictère et disparaît rapidement après le début des signes cliniques avec l'apparition des anti-HBe.

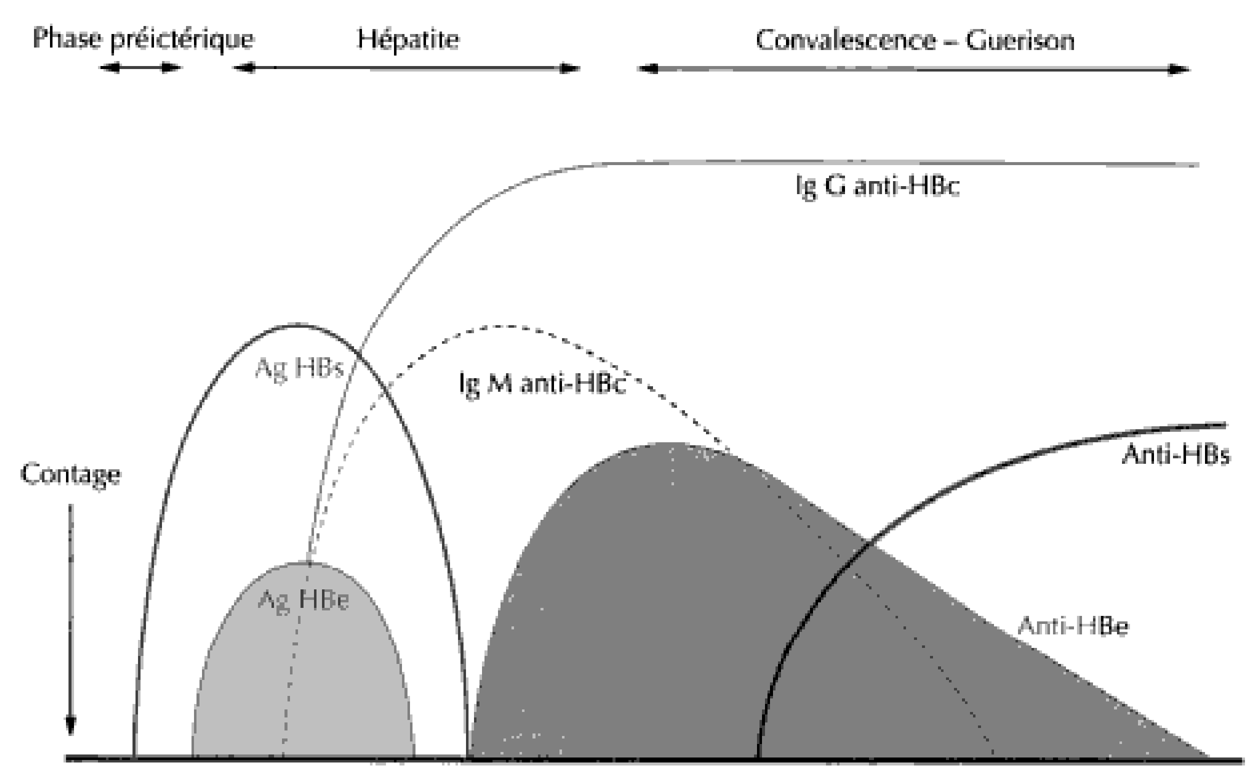


Figure 4. Diagnostic virologique d'une hépatite aiguë B (d'après F. LUNEL)

2. Hépatite fulminante

Elle complique 1 % des hépatites aiguës B symptomatiques. Elle est définie par l'apparition d'encéphalopathie hépatique associée à une diminution du facteur V entre les 15 premiers jours de l'ictère et jusqu'à 3 mois après.
Le VHB est la plus grande cause d'hépatite fulminante d'origine virale dans le monde. L'évolution fulminante est très fréquente en cas de co-infection par le VHD. En absence de transplantation, la mortalité est d'environ 80 %.

3. Hépatite chronique

Le principal problème de l'infection virale B est celui du portage chronique de l'Ag HBs. Entre 0,5 et 10 % des sujets immunocompétents contaminés deviennent porteurs chroniques ; mais cela est plus fréquemment.
observé chez les enfants infectés tôt dans la vie (jusqu'à 90 % des cas) ou chez les immunodéprimés (entre 30 et 100 %). Il semblerait que l'absence de passage à la chronicité soit associée à une forte réponse immune cellulaire dirigée contre les Ag HBc et HBe avec un profil TH1.

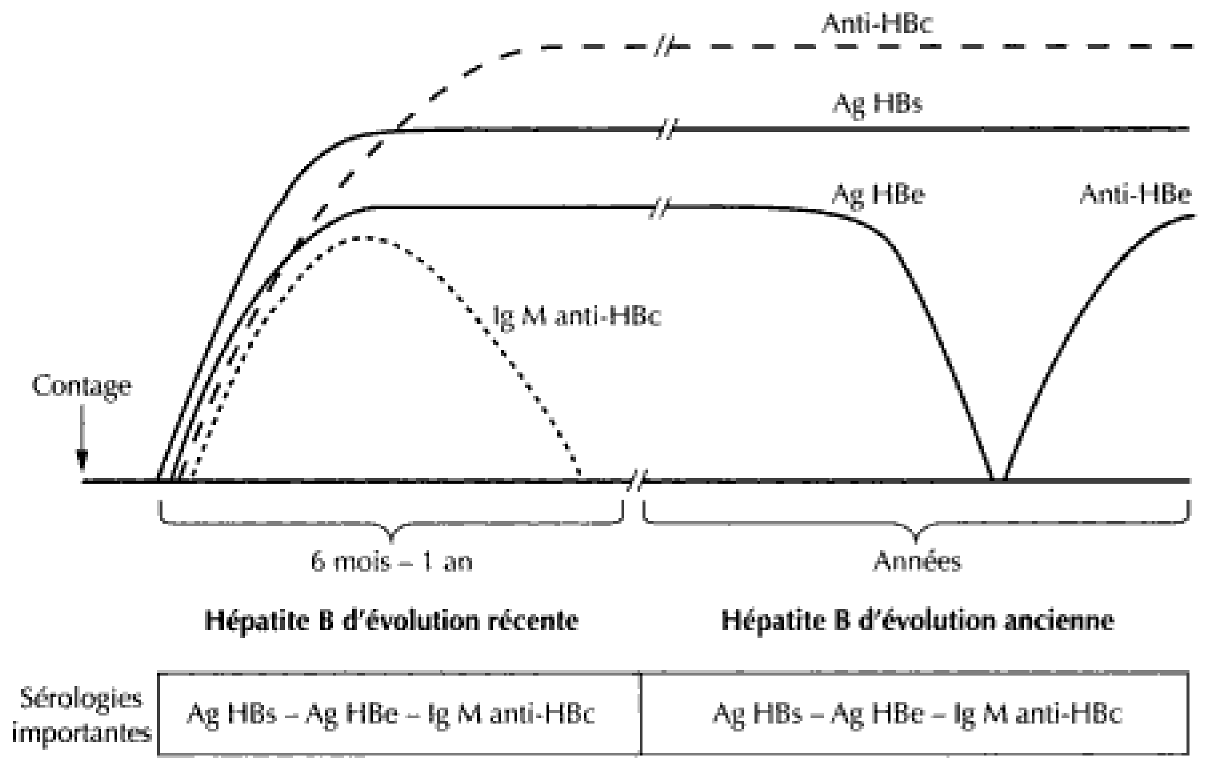


Figure 5. Évolution des marqueurs VHB lors d'une évolution vers la chronicité

Classiquement, l'infection chronique est définie par le portage de L'Ag HBs 6 mois après l'hépatite aiguë, mais avec différentes présentations :

- le portage sain : 1/3 des porteurs chroniques de l'Ag HBs. Ils sont asymptomatiques avec des aminotransférases normales et des Ac anti-HBe positifs ; l'ADN viral est indétectable par hybridation et l'histologie du foie est normale ;
- environ 2/3 des patients porteurs de l'Ag HBs avec des transaminases élevées vont développer des lésions d'hépatite chronique définie par l'association de nécrose inflammatoire et de fibrose, depuis au moins 6 mois après l'infection aiguë. L'évolution naturelle peut être schématisée en trois phases :
  - la première phase de durée variable est marquée par une multiplication active du virus (Ag HBs, Ag HBe et ADN dans le sérum) et des lésions histologiques minimes. Le sujet est très contagieux,
  - la deuxième phase est caractérisée par un arrêt progressif de la multiplication virale mais des lésions histologiques de nécrose hépatocytaire, avec élévation importante de aminotransférases,
  - au cours de la troisième phase, le sujet est toujours porteur de l'Ag HBs, les anomalies biochimiques sont peu importantes, les signes de multiplication virale ont généralement disparu mais les lésions histologiques caractérisent le plus souvent une cirrhose, avec une destruction plus ou moins importante du parenchyme hépatique. On estime qu'entre 20 et 30 ans après le contage, le risque d'évolution vers la cirrhose est de 20 %. Le risque de développer un carcinome hépatocellulaire est compris entre 3 et 5 % par an chez les patients cirrhotiques.

Dans l'histoire naturelle de l'infection chronique B, la séroconversion Ag HBe/Ac anti-HBe et/ou Ag HBs/Ac anti-HBs avec arrêt de la multiplication virale ne met pas à l'abri de possibles réactivations ultérieures. Une réactivation est définie par une réponse de la multiplication virale (ADN du VHB détectable) associée à une cytolyse.

Elle est souvent symptomatique et favorisée par une immunodépression, et elle facilite l'évolution vers la cirrhose.
Les manifestations extrahépatiques au cours de l'hépatite B chronique sont la périartérite noueuse (20 à 50 %) et la glomérulonéphrite extramembraneuse.

D. Physiopathologie

La cytopathogénicité directe du VHB est peu importante. Le VHB se réplique essentiellement dans les cellules hépatiques mais aussi probablement dans les cellules mononucléées, même si la réplication y est peu active.
C'est le conflit entre virus et défenses immunitaires qui va déterminer la gravité de l'infection et le polymorphisme de l'hépatite B.
Les défenses immunitaires mettent en jeu deux mécanismes : le premier type de réponse anticorps est fondé sur les propriétés spécifiques des récepteurs Ig des cellules B (immunité humorale). Il existerait une cytotoxicité humorale avec des complexes immuns circulants. Le second mécanisme est fondé sur les propriétés de reconnaissance des récepteurs des cellules T qui identifient les Ag viraux métabolisés en peptides à la surface des hépatocytes, en association avec les molécules HLA de classes I et II.
Dans le cadre d'*une hépatite aiguë*, la réponse immunitaire est intense, polyclonale et multispécifique pour toutes les protéines virales, et elle aboutit à l'élimination virale complète (virus extracellulaire et cellules infectées).
Dans l'*hépatite chronique*, la réponse immunitaire T est faible et plus restreinte sur le plan antigénique. La nécrose hépatocytaire s'accompagne de phénomènes inflammatoires. Le parenchyme lobulaire sera progressivement remplacé par du tissu fibreux.
Dans l'*hépatite fulminante*, les lésions hépatiques sont la conséquence d'une destruction massive des hépatocytes, due à une réponse immunitaire cellulaire excessive et à des phénomènes plus complexes humoraux et toxiques.

E. Diagnostic et suivi biologique

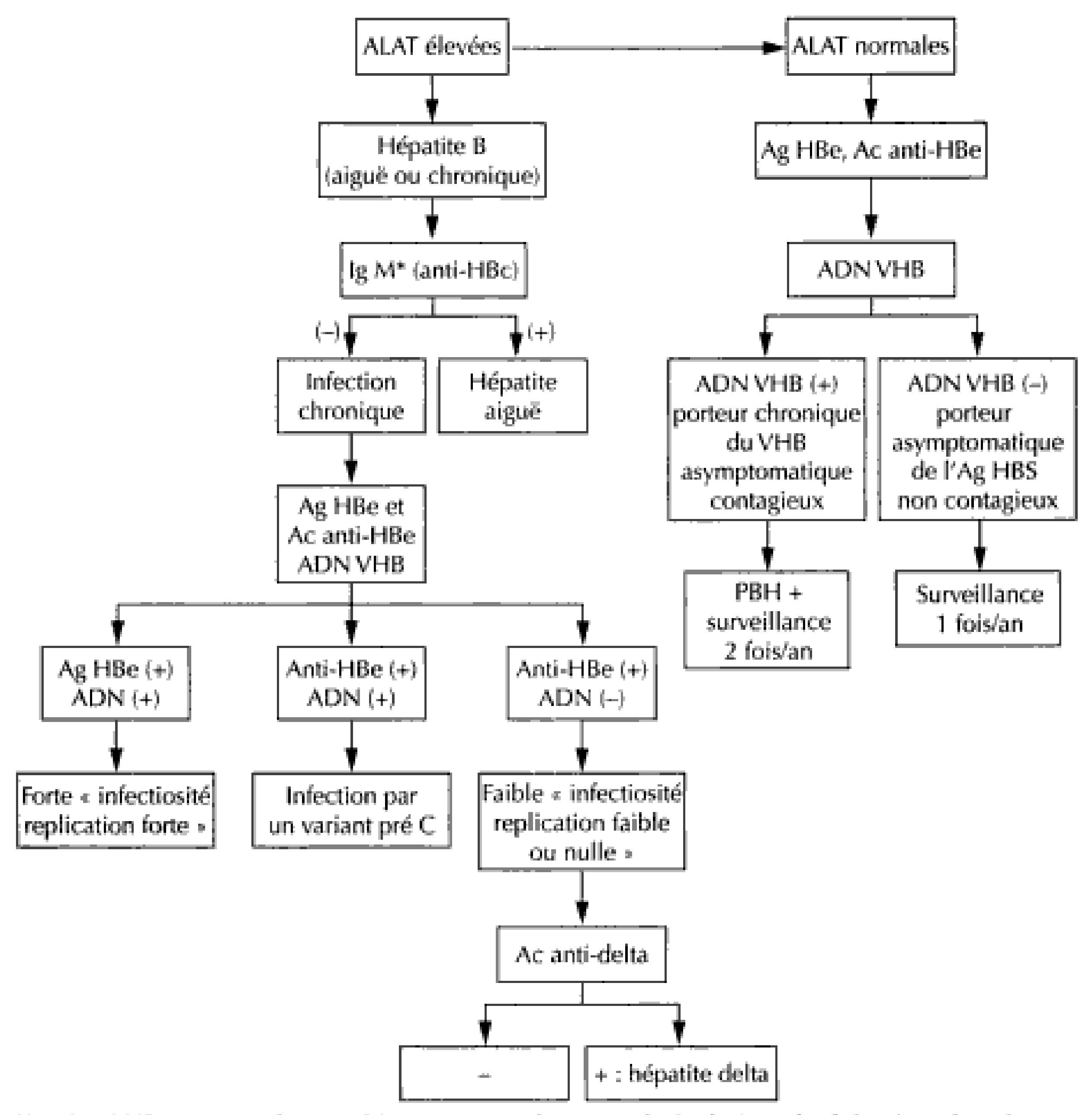
Le diagnostic de l'infection par le VHB résulte de la confrontation des données cliniques et biologiques (biochimiques, sérologiques, virologiques, histologiques).

1. Les marqueurs de l'hépatite B

On utilise des tests sérologiques pour rechercher les Ac dirigés contre les différents Ag du VHB (anti-HBc, anti-HBc, anti-HBs) et pour détecter les éléments constitutifs du virus, c'est-à-dire les Ag viraux (Ag HBs, Ag HBe), et des tests moléculaires identifiants l'ADN viral.
Les différentes techniques utilisées sont : Elisa, Meia ou Ria.

a) Système Ag HBs – Ac anti-HBs

L'Ag HBs est détecté dans le sérum par Elisa en utilisant des Ac monoclonaux reconnaissant l'épitope « a » du gène S, commun aux différents virus B. C'est le premier marqueur à apparaître au cours de l'infection par le VHB. Il reste détectable



*Les Ig M HBc peuvent être positives au cours des poussés évolutives des hépatites chroniques.

Figure 6. Conduite à tenir devant un patient Ag HBs + (d'après F. LUNEL)

entre 4 et 6 semaines. Sa disparition signe une évolution favorable de l'infection. Sa persistance caractérise l'évolution vers la chronicité. Une sérologie Ag HBs + doit être contrôlée, selon la nomenclature des actes biologiques, par un 2nd prélèvement, et complétée par la recherche d'autres marqueurs.
Les Ac anti-HBs apparaissent en général après l'élimination de l'Ag HBs, affirmant l'élimination virale et la guérison. Chez le sujet vacciné, leur présence est témoin de l'immunisation.

b) Système Ag HBc – Ac anti-HBc

L'Ag HBc ne peut être recherché que sur une biopsie hépatique par immunohistochimie.
Les Ac anti-HBc sont les premiers Ac à apparaître. Les IgM témoignent une infection récente. Néanmoins, ils peuvent être présents lors d'une infection chronique

ou d'une phase de réactivation. Les IgG anti-HBc restent détectables des années après la guérison. C'est le marqueur de choix d'une infection B ancienne.

c) Système Ag HBe – Ac anti-HBe

La détection de l'Ag HBe signe une infection virale active avec réplication ; c'est un marqueur indirect de l'infectivité.
La séroconversion anti-HBe avec élimination de l'Ag HBe est un élément pronostique favorable au cours de l'hépatite chronique. Cependant, la présence d'Ac anti-HBe ne permet pas d'affirmer une absence de réplication virale. En effet, le profil Ag HBe négatif mais Ac anti-Hbe + correspond à la présence de variants d'échappement (mutants pré-C) à la réponse immunitaire, signifiant un mécanisme de persistance virale. Dans ce cas, l'ADN du VHB dans le sérum est détectable.
La détection de *l'Ag pré-S1 et pré-S2* n'est pas utilisée en pratique courante. Leur présence dans le sérum par Ria (pré-S1) ou Elisa sandwich (pré-S2) semble corrélée de façon significative avec la réplication virale dans l'hépatite B chronique active.

d) L'ADN du VHB sérique

La recherche de l'ADN viral est sans intérêt lors d'une hépatite aiguë.
L'ADN du VHB est recherché et quantifié dans le sérum. La détection se fait par hybridation moléculaire (Spot-test). Des techniques semi-quantitative et quantitative (hybridation en phase liquide) permettent d'apprécier la quantité d'ADN viral et l'intensité de la réplication du virus, avec une sensibilité de précision d'environ 1 pg/mL pour le test quantitatif. Les tests quantitatifs sont utilisés pour surveiller l'évolution de la réplication au cours de l'histoire naturelle de l'infection chronique B et au cours des traitements antiviraux ; et plus particulièrement pour mettre en évidence des discordances entre la sérologie HBe et ADN viral (variants Ag HBe négatif).
Par une technique d'amplification enzymatique de séquences d'acides nucléiques viraux ou *PCR*, on peut actuellement détecter dans le sérum, le foie ou les cellules mononuclées, du sang des molécules d'ADN viral avec une sensibilité d'environ 10 à 100 particules par mL. L'analyse qualitative des génotypes viraux permet d'identifier des mutations ponctuelles dans la région pré-C. La technique quantitative de mesure de l'ADN viral par un test d'ADN branché permet de diagnostiquer une faible réplication virale chez les patients ayant un variant Ag HBe négatif, et de surveiller la réplication au cours des traitements antiviraux.

VI. Hépatite à virus C (VHC)

Le virus de l'hépatite C a été identifié comme responsable depuis une vingtaine d'années de la majorité des hépatites non-A non-B post-transfusionnelles.
Il a été séquencé en 1989 d'une façon tout à fait exemplaire par biologie moléculaire, à partir du plasma d'un chimpanzé expérimentalement infecté par le sang d'un patient présentant une hépatite post-transfusionnelle non-A non-B.
Le problème avec ce virus est la fréquence des porteurs chroniques après une infection aiguë, puisque 80 % des sujets deviennent porteurs chroniques avec pour risque majeur l'évolution vers une cirrhose et un hépatocarcinome.

A. Le virus

Aujourd'hui, le VHC est classé dans la famille des *Flaviridae* genre *Hepacivirus*. Il n'est pas cultivable *in vitro* sur cellules.
C'est un virus de 55 à 65 nm de diamètre, à capside icosaédrique, enveloppé, à ARN simple brin de polarité positive. Son génome, long de 95 000 nucléotides, est constitué d'un cadre ouvert de lecture unique encadré de 2 régions non codantes très conservées.

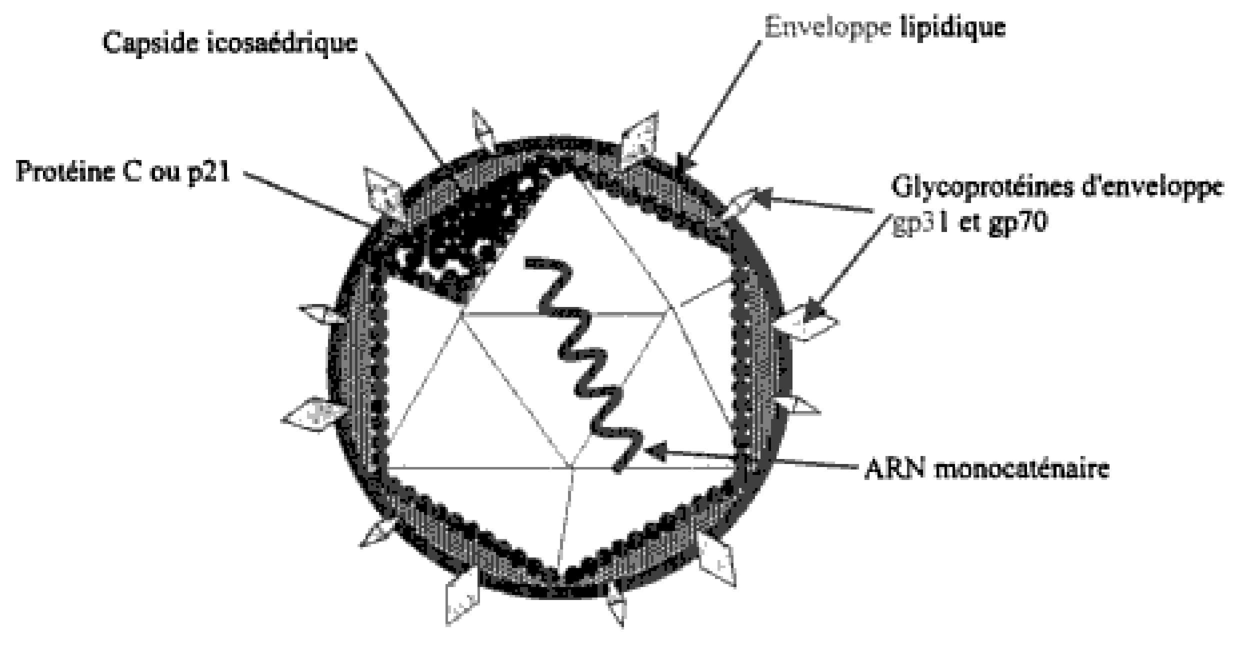


Figure 7. Virus de l'hépatite C

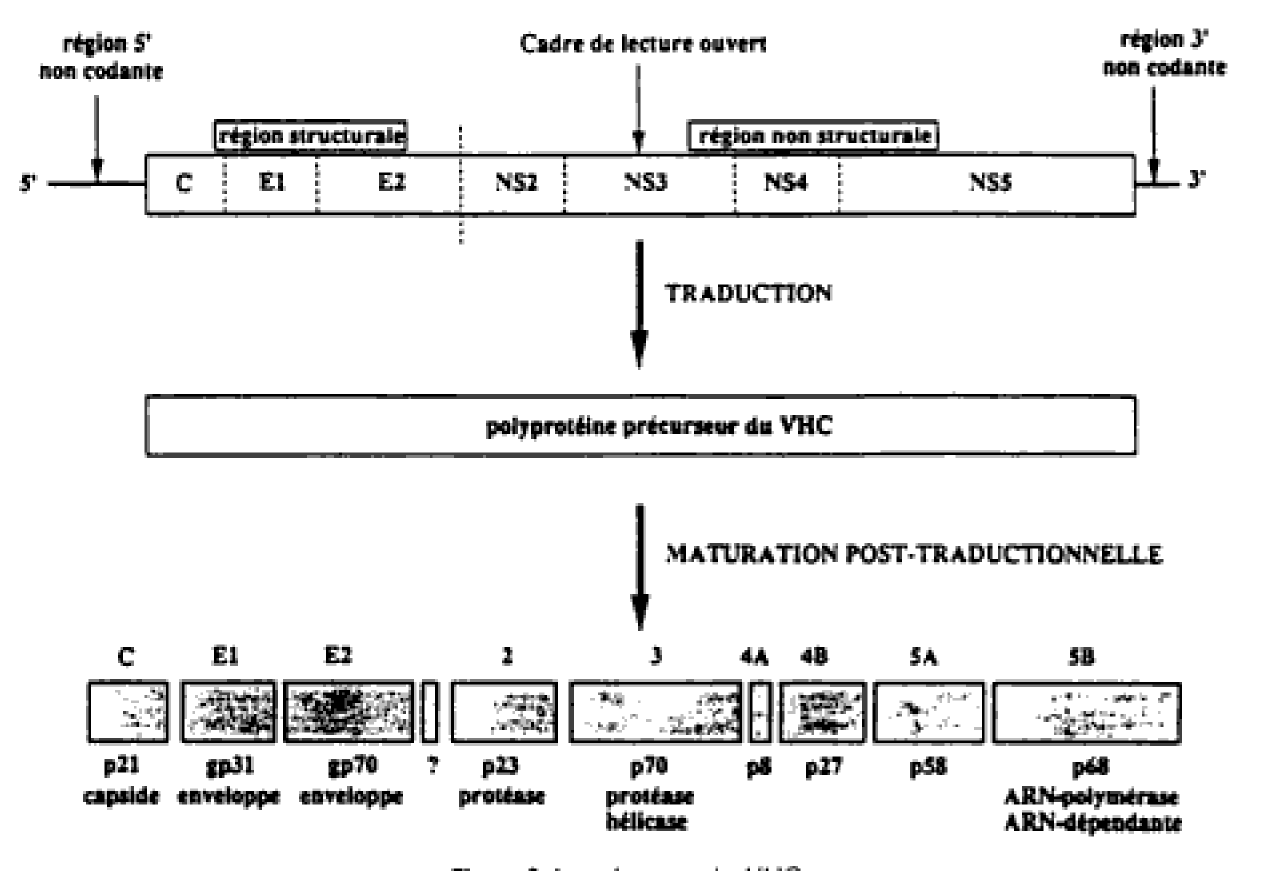


Figure 8. Le génome du VHC

La traduction de ce cadre de lecture aboutit à une polyprotéine précurseur dont la région N terminale est constituée des protéines structurales (une protéine de capside C et 2 protéines d'enveloppe E1 et E2) et la région C terminale des 6 protéines non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). Le clivage des protéines structurales est assuré par des peptidases cellulaires, celui des protéines non structurales par des protéases virales (*fig. 9*).

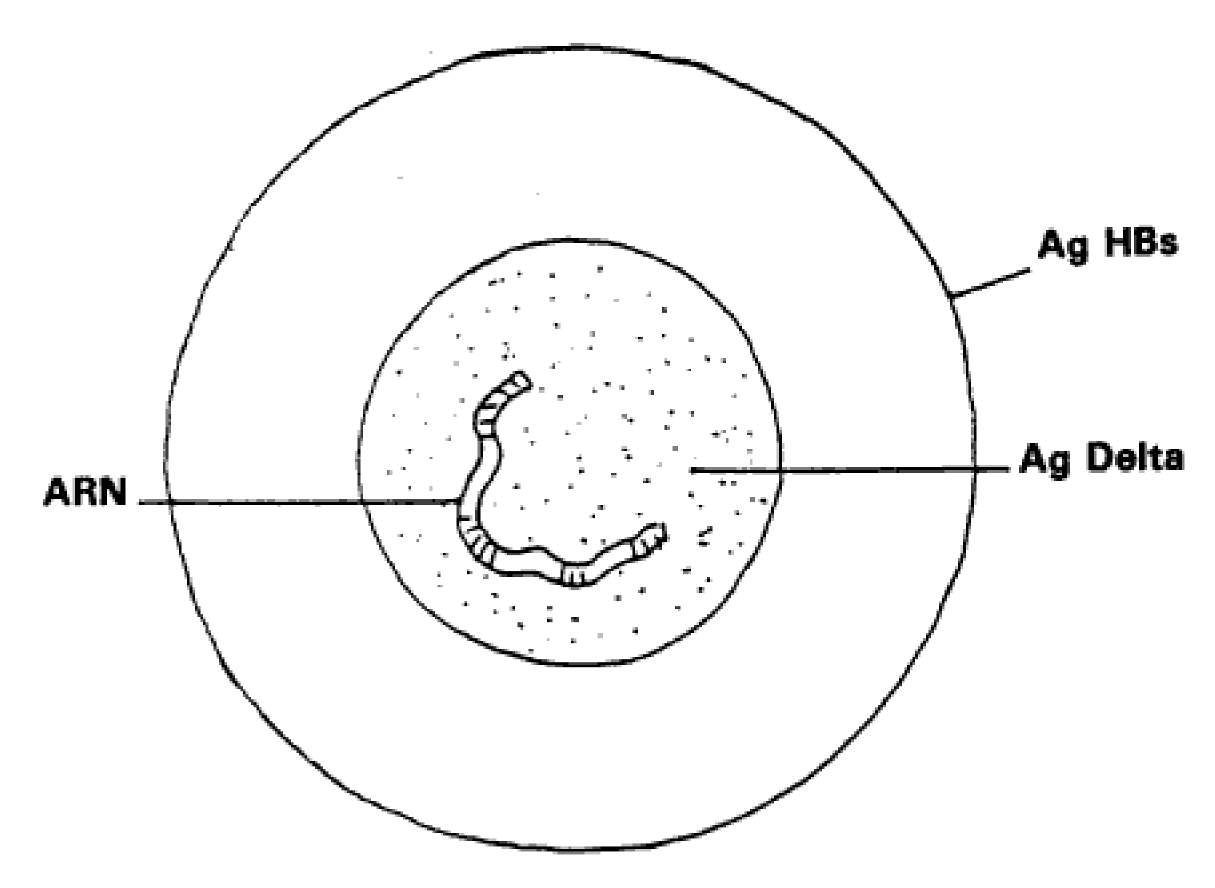


Figure 9. Structure du virus Delta

La région 5' non codante (5'NC) permettrait la traduction du cadre de lecture ouvert et sa régulation, et la régulation de la réplication virale.
La protéine NS2 et l'extrémité N terminale de NS3 forment un complexe protéasique responsable du clivage NS2/NS3.
La protéine NS3 a une double activité de protéase et hélicase jouant ainsi un rôle majeur au cours de la traduction et de la réplication virale.
La protéine NS5 possède une activité ARN polymérase ARN dépendante, et intervient dans la réplication du génome viral. Une courte région de NS5, appelée ISDR (*interferon sensitivity determining region*), est capable de se lier à la PKR (protéine kinase cellulaire induite par l'interféron α) et ainsi supprime l'activité antivirale de la PKR.
Comme beaucoup d'autres virus à ARN, le VHC présente une hétérogénéité génomique importante. On dénombre 6 génotypes majeurs désignés par un chiffre arabe. Les sous-types désignés par une lettre minuscule s'individualisent au sein des génotypes (1a, 1b, 1c...).

B. Épidémiologie et transmission

Chaque génotype a une *distribution géographique* qui lui est propre et une distribution particulière en fonction des différents modes de contamination. La *relation entre caractéristique clinique ou thérapeutique et le génotype* est plus controversée. Par exemple, le génotype 1b serait associé à une progression plus rapide et plus sévère de l'hépatite, et surtout à une moindre réponse au traitement par l'interféron α que les autres génotypes. En France, le sérotonine 1b prédomine chez les sujets contaminés par transfusion ; les types 1a et 3a sont majoritaires chez les toxicomanes utilisant la voie veineuse.

L'épidémiologie et la transmission de l'hépatite C ont évolué depuis une vingtaine d'années.

En France, ce virus s'est répandu de manière silencieuse entre les années 1960 et 1980 par *transfusion sanguine*, puis a touché massivement les *toxicomanes* utilisant la voie veineuse. Actuellement, si la transmission transfusionnelle est maîtrisée avec un risque résiduel estimé à 2,7 par million de dons entre 1996 et 1998, l'existence d'une transmission *nosocomiale* non transfusionnelle est de mieux en mieux documentée. Elle serait la deuxième cause d'infection après la toxicomanie par voie IV, avec pour origine une transmission par la transplantation d'organes ou de tissus, l'hémodialyse, l'hospitalisation en unités de soins intensifs, les procédures médico-chirurgicales invasives (endoscopies avec biopsies), les procédures anesthésiques ou les soins dentaires.

La transmission sexuelle existe mais est très faible. Celle mère-enfant est d'environ 3 %, mais elle concerne surtout les mères co-infectées par le VIH chez qui le risque de transmission est évalué à 20 %.

En *France*, la prévalence de la séropositivité au VHC est d'environ 1,1 %, avec entre 500 000 et 600 000 personnes porteuses du virus. La prévalence varie selon les régions (celle de la région Rhône-Alpes-Côte d'Azur serait la plus élevée). Elle augmente avec l'âge surtout chez les femmes après 50 ans. En 1998, 50 % des patients séropositifs connaissaient leur statut sérologique.

Au niveau de l'*Union européenne*, 2,5 millions de personnes étaient séropositives en 1996 (avec une séroprévalence de 3 % en Italie).

L'*OMS* estime qu'actuellement, plus de 150 millions de sujets seraient porteurs du virus dans le monde. L'infection par le VHC est un réel problème de santé publique.

L'épidémie due au VHC est ubiquitaire avec des prévalences allant de 0,5 à 5 % de la population générale, selon les pays.

Trois zones schématiques de séroprévalence se distinguent :

- une zone de basse endémicité avec moins de 0,5 % de séroprévalence : pays scandinaves, Australie, Canada et Suisse ;
- une zone de prévalence intermédiaire autour de 1 % : Europe de l'Ouest et USA ;
- une zone de forte endémicité : Europe de l'Est, Asie, Afrique, Amérique du Sud.

En France et aux USA, le génotype 1b est prédominant et représente entre 40 et 50 % des sujets infectés, puis viennent les génotypes 1a et 3a. En Afrique noire et au Moyen-Orient, le génotype 4 est dominant. Le génotype 6 prédomine à Hongkong, Macao et au Viêt Nam.

C. Histoire naturelle de l'hépatite C

Elle est caractérisée par une *hépatite aiguë* le plus souvent asymptomatique survenant après 35 à 84 jours d'incubation. L'ictère est observé chez environ 10 % des patients. Le plus souvent, le diagnostic de l'infection est rétrospectif et réalisé habituellement au stade d'hépatite chronique.
Le risque d'hépatite fulminante est rare et reste discuté.
60 à 80 % des patients infectés par le VHC vont évoluer vers la chronicité et environ 30 % vont guérir spontanément.
Les patients ayant une *infection chronique* ont, dans environ 50 à 80 % des cas, une élévation persistante mais souvent modérée des transaminases associées aux AC anti-VHC. Pour distinguer les patients virémiques à transaminases normales des patients guéris non virémiques, la détection du génome viral par PCR s'impose. Si cette dernière est positive, une biopsie hépatique sera réalisée.
La prise en charge diagnostique et thérapeutique précoce est justifiée dans l'histoire naturelle de l'infection par le VHC pour éviter la cascade évolutive de l'hépatite aiguë à l'hépatite chronique, de l'hépatite chronique à la *cirrhose*, et de la cirrhose à *l'hépatocarcinome*.
L'*hépatite chronique* est très hétérogène dans son évolution. Dans 20 % des cas, elle évolue vers la cirrhose. Trois facteurs principaux participent au risque de cirrhose : la durée d'infection virale (si supérieure à 20 ans), l'âge au moment de la contamination et un alcoolisme associé.
Les états d'immunodépression ou une infection associée au VIH accélèrent le développement de la cirrhose. La co-infection VIH-VHC entraîne des modifications des caractéristiques sérologiques de l'infection virale C. La recherche par PCR de l'ARN sérique du VHC est alors indispensable.
Cirrhose et carcinome hépatocellulaire surviennent en moyenne entre 20 et 30 ans après la contamination.
Le VHC a un double tropisme, hépatotrope et lymphotrope.
Les *manifestations extrahépatiques* d'origines immunologiques dues au VHC sont principalement :

- des cryoglobulinémies mixtes, avec des atteintes rhumatologiques, rénales, neurologiques, cutanées ou générales ;
- des glomérulonéphrites membrano-prolifératives ;
- des manifestations auto-immunes avec des auto-AC antinucléaires, antimuscles lisses, anti-LKM1 ; sont associés à l'infection d'authentiques hépatites auto-immunes de type 1 ou 2, le syndrome de Sjögren, le lichen plan, une thyroïdite auto-immune, ou la porphyrie cutanée tardive de type 1.

Chez *l'enfant et le nouveau-né*, l'infection se fait après l'accouchement. L'hépatite du nouveau-né débute entre 2 et 3 mois après l'accouchement. Un tiers des infections postnatales guérissent spontanément. Le diagnostic se fera par l'identification de l'ARN du VHC au 12e mois de la vie. Les hépatites chroniques sont peu actives biologiquement et histologiquement, et seront sous surveillance à long terme.

D. Pathogenèse

Bien que le VHC ne s'intègre pas dans l'ADN cellulaire au cours de son cycle biologique, le VHC est un facteur étiologique du cancer primitif du foie.
La réponse immunitaire dirigée contre le VHC semble faible et expliquerait la forte prévalence des formes chroniques. Pour persister, le virus doit réguler son potentiel cytolytique et échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.
La *variabilité génomique* du VHC chez un patient est le reflet de l'adaptation du virus à son hôte par des mécanismes de sélection actifs, et résulte d'une combinaison de facteurs viraux et de facteurs liés à l'hôte. Les pressions de sélection au cours de l'infection sont liées à des contraintes structurales et fonctionnelles du virus, à la réponse immunitaire, au traitement par l'interféron et au tropisme cellulaire.
Chez les individus infectés, le virus initial évolue sous forme d'un mélange complexe de variants, circulants, génétiquement distincts mais apparentés. Cette distribution en *quasi-espèces* du virus est le reflet de son adaptation permanente à son environnement sur le mode mutations-sélections. L'ARN polymérase ARN dépendante virale commet des erreurs au cours de la réplication. Elle est incapable de relire la séquence d'ARN qu'elle vient de polymériser et de corriger les erreurs éventuellement commises (absence d'activité dite de relecture-correction).
L'hypervariabilité de l'extrémité N terminale de E2 est la cible d'AC neutralisants et transitoires capables de se lier aux virions et de former des complexes immuns. La *réponse immunitaire à médiation humorale* ne permet pas l'éradication du virus mais induit la sélection de nouveaux mutants que les AC préexistants sont incapables de reconnaître.
La *réponse cellulaire* est cependant présente. Les lymphocytes $CD8^+$ cytotoxiques exercent également une pression à l'origine de la sélection de mutants capables de leurs échapper. L'émergence de variants non reconnus par les lymphocytes $CD4^+$ auxiliaires, intervenant au cours de l'activation et de la différenciation des lymphocytes B et T cytotoxiques, est aussi probable. L'échappement à cette réponse immunitaire à médiation cellulaire favorise donc l'évolution vers la chronicité.
Il semblerait que la *résistance au traitement à l'interféron α* soit liée à de multiples mutations distribuées à travers le génome, permettant à des variants d'échappement d'être sélectionnés par la réponse immunitaire stimulée par l'interféron α.
La distribution en quasi-espèces du VHC pourrait également s'expliquer par une sélection liée au *tropisme cellulaire* (pas seulement hépatique), et à une réplication favorisée pour certains variants dans certaines autres cellules que les hépatocytes.
L'absence de système cellulaire de culture *in vitro* et de modèle animal sensible à l'infection par le VHC (excepté le chimpanzé) et peu coûteux limite les recherches de nouvelles stratégies vaccinales et thérapeutiques pour le traitement de l'hépatite C chronique.

E. Diagnostic et surveillance

Le diagnostic de l'infection par le VHC comporte :
- des tests biochimiques (*cf. supra*) ;
- des tests sérologiques indirects ;
- des tests directs qualitatifs et quantitatifs de recherche de l'ARN viral ;

- des examens histologiques à partir d'une biopsie hépatique en cas d'hépatite chronique.

1. Tests sérologiques

Les tests sérologiques actuellement commercialisés utilisent comme source d'antigènes un mélange de peptides synthétiques ou de protéines recombinantes correspondant aux protéines de structure (surtout capside) et non structurales (NS3, NS4, NS5). Les tests Elisa de 3e génération permettent un diagnostic précoce et sont utilisés lors d'un dépistage sérologique.
L'immunoblot, ou Riba (*Recombinant immunoblot assay*), de 3e génération contient 5 protéines du VHC ; il est utilisé pour le contrôle en cas de résultats positifs ou douteux de l'Elisa, et lors de l'infection chronique.

2. Tests de biologie moléculaire

- La *PCR* permet la détection *qualitative* de l'ARN viral (ex. : Amplicor). Le seuil de détection est actuellement de 10 à 100 copies/mL et le test est automatisable. Le test par *PCR nichée* (*nested-PCR*) utilise 2 couples d'amorces spécifiques et possède de ce fait une spécificité supérieure.
- La *quantification de l'ARN du VHC* dans le sang reflète le niveau de réplication virale dans l'organisme ; elle est recommandée surtout dans le suivi clinique et thérapeutique. Elle fait appel à deux types de techniques spécifiques :
  - la technique d'amplification de la cible par transcription inverse-PCR quantitative non compétitive (ex. : Amplicor HCV Monitor) ;
  - la technique d'amplification du signal par ADN branché (ex. : Quantiplex HCV RNA 0,2).

  Avec ces 2 méthodes, seules les variations supérieures à 0,5 $\log_{10}$ copies/mL doivent être prises en considération pour mettre en évidence une différence d'un facteur 5 entre 2 prélèvements.
- Des tests permettent le *typage du génome* du VHC. Plusieurs méthodes de génotypage viral ont été décrites : l'étude du polymorphisme de restriction après digestion des produits amplifiés par des enzymes de restriction, la PCR spécifique de type, l'hybridation inverse des produits de PCR avec une gamme de sondes spécifiques de type (c'est actuellement la plus utilisée avec des tests standardisés), et enfin le séquençage après clonage (région NS5) qui est extrêmement utile pour explorer des cas groupés d'infections nosocomiales ou familiales.

Également, des techniques de sérotypage, à partir du sérum des patients, sont fondées sur la détection d'anticorps dirigés contre des épitopes viraux connus spécifiques des différents types. Ces derniers sont facilement utilisables dans les laboratoires d'analyse. Le taux de concordance entre sérotypage et les tests moléculaires est d'environ 95 %.

3. Surveillance

La démarche du diagnostic sérologique pratiqué en *première intention* est le *test Elisa*. Si le résultat est positif ou douteux, la nomenclature des actes de biologie médicale préconise un contrôle sur un 2nd prélèvement sanguin avec un réactif Elisa différent du premier.

L'immunoblot est le test de contrôle sérologique après Elisa et il donne des éléments en faveur ou non d'une infection chronique. Si le profil de l'immunoblot associe des AC anti-capside et anti-NS3, la probabilité de virémie est élevée. L'évolution du profil immublot est à suivre, avec une positivité qui diminuera en cas d'évolution favorable. En cas de sérologie VHC négative ou discordante, la PCR qualitative est recommandée dans certaines situations (par exemple, diagnostic précoce d'un risque de contamination par piqûre, infection d'un enfant né de mère séropositive). Si l'ARN viral persiste plus de 6 mois, l'évolution de la chronicité est à craindre. Aucun cadre de surveillance sérologique à long terme n'est actuellement défini.

La décision de traitement sera fondée sur une élévation du taux des Alat sériques, des lésions hépatiques histologiques, avec ou sans cirrhose, et une virémie positive. Les examens viraux préthérapeutiques incluent une mesure de la charge virale et un génotypage du VHC. La surveillance postthérapeutique repose sur le dosage régulier des Alat et la recherche de l'ARN.

La ponction biopsie hépatique est un examen clé dans la prise en charge des patients atteints d'hépatite chronique : sur le plan pronostic, sur le plan diagnostique pour évaluer la sévérité des lésions nécro-inflammatoires et le degré de fibrose, pour diagnostiquer une cirrhose ou un hépatocarcinome, pour surveiller l'évolution et la progression des lésions en comparant les résultats de différentes biopsies, et pour évaluer l'efficacité d'un traitement en cours et après arrêt.

L'essentiel de la question

Les hépatites virales représentent un réel problème de santé publique du fait de leur possible évolution pour certaines d'entre elles vers la cirrhose et l'hépatocarcinome.

Les hépatites d'origine virale sont essentiellement provoquées par 6 virus : VHA, VHB, VHC, VHD, VHC et VHE. Mais d'autres virus sont éventuellement hépatotropes.

Ces virus des hépatites appartiennent à des familles différentes. Ce sont des virus à ARN, sauf le VHB à ADN partiellement bicaténaire.

Ces virus sont généralement non cultivables ou très difficiles à isoler en cultures cellulaires. Leur réplication dans les hépatocytes est fonction de leur structure génomique. La variabilité génomique du VHB et du VHC est due à l'apparition de mutations dans certaines régions variables du génome, ce qui explique la complexité de leur pathogénèse et des résistances aux traitements aux antiviraux.

Leurs modes de transmission diffèrent : soit entéral (VHA et VHE), soit parentéral et sexuel (VHB, VHD et VHC). La transmission mère/enfant est possible pour les VHB et VHC.

L'épidémiologie des hépatites virales est très différente selon qu'il s'agisse de pays industrialisés ou de pays en développement avec des zones de haute, de moyenne ou de faible endémicité selon les pays concernés.

Les formes cliniques paucisymptomatiques ou asymptomatiques sont les plus fréquentes.

Lorsqu'elles sont symptomatiques, les hépatites virales peuvent se présenter :

- sous forme d'une hépatite aiguë évoluant soit vers la guérison, soit vers la chronicité ;
- sous forme d'une hépatite fulminante ;
- sous forme d'une hépatite chronique (VHB, VHD et VHC).

Toutes les hépatites symptomatiques se manifestent par un ensemble de signes cliniques semblables qui ne permettent pas de les différencier cliniquement, excepté l'évolution possible vers la chronicité.

Il n'y a pas d'immunité croisée entre les différentes hépatites.
Seuls les diagnostics biologiques et virologiques permettront de différencier les hépatites entre elles par des tests spécifiques accessibles aux laboratoires de biologie. Ces tests concernent le dosage de marqueurs biochimiques, la recherche de lésions histologiques hépatiques (biopsie du foie en cas d'hépatite chronique) et le suivi des marqueurs sérologiques. Ces derniers sont réalisés par la recherche des antigènes viraux, du génome et/ou des anticorps témoins d'une réponse immunitaire active.
Il existe actuellement des thérapeutiques antivirales efficaces contre les hépatites chroniques B et C. L'interféron α et les analogues nucléosidiques comme la lamivudine contre le VHB, ou la ribavirine contre le VHC, sont actuellement très utilisés avec des résultats encourageants. Dans le domaine de la thérapeutique contre les hépatites chroniques, les grands progrès à venir reposent sur les associations d'antiviraux (cf. article sur les antiviraux).
Actuellement, seules les hépatites A et B peuvent être prévenues par la vaccination. Le vaccin contre le VHB est préparé par génie génétique ; ce vaccin est actuellement incorporé dans le calendrier vaccinal des enfants et prévient contre l'hépatocarcinome hépatique à VHB.

Pour en savoir plus

- Quaranta J.-F., Reboulot B., Cassuto J.-P. Infection par le virus de l'hépatite C. *Rev Prat* 2000 ; 50, 10 : 1057-110.
- Quaranta J.-F., Reboulot B., Cassuto J.-P. *Hépatites virales*, Masson, 1996.
- Pol S., Fontaine H. Hépatites virales. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris). Maladies Infectieuses, 8-065-F-10, Pédiatrie, 4-310-C-10, 1998 : 1-22.

Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV)

J. IZOPET, R. BAURIAUD, C. PASQUIER
Laboratoire de virologie – bactériologie, Institut fédératif de biologie, CHU, Toulouse.

En juin 1981, une courte publication dans le Morbidity and Mortality Weekly Report du CDC (Centers for Disease Control and Prevention) d'Atlanta aux USA décrit cinq cas de pneumonie à Pneumocystis jiroveci survenus à Los Angeles chez des hommes jeunes homosexuels et préalablement sains. C'était la première description du Sida (syndrome d'immunodéficience acquise). Le CDC est informé également que plusieurs cas de maladies de Kaposi, affections très rares jusqu'alors, ont été diagnostiqués récemment chez les homosexuels de San Francisco, Los Angeles et New York. En six semaines, 70 cas sont recensés. Peu après 1981, des cas semblables ne tardent pas à être signalés dans d'autres pays du monde.
Ces maladies sont liées à un déficit profond de l'immunité cellulaire. Après les homosexuels, d'autres groupes exposés sont identifiés, toxicomanes consommateurs de produits injectables, hémophiles recevant des facteurs de la coagulation, partenaires sexuels de personnes appartenant à ces groupes et enfants nés de mères atteintes du Sida.
Devant ces éléments, seule l'hypothèse d'un agent de nature infectieuse, transmissible par voie sanguine ou sexuelle, capable de provoquer un déficit immunitaire, pouvait rendre compte de l'ensemble de ces caractéristiques. La mise en évidence de cet agent infectieux est réalisée par F. Barré-Sinoussi dans le laboratoire de L. Montagnier en 1983 à partir d'un ganglion d'un homosexuel présentant un syndrome avec des adénopathies persistantes généralisées. Il s'agit d'un rétrovirus humain appelé à cette époque LAV (Lymphadenopathy Associated Virus). Plusieurs équipes américaines (R. Gallo, J. Levy) confirment cette découverte un an plus tard et le virus reçoit alors divers noms (HTLV III, ARV...). Par la suite, une commission de nomenclature internationale rebaptise le virus appelé dès lors sur sa désignation anglaise HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) ou française VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine). En 1986, un second virus HIV-2 est isolé par F. Clavel chez des sujets originaires d'Afrique de l'Ouest. En 1987, l'AZT ou zidovudine est le premier médicament antirétroviral disponible.

I. Classification des virus HIV

Le HIV appartient à la famille des *Retroviridae*, à la sous-famille des *Orthoretrovirinae* et au genre Lentivirus comportant 2 espèces infectant l'homme : HIV-1 et HIV-2. HIV-1 est le virus le plus répandu dans le monde. HIV-2 présente une localisation plus restreinte, surtout en Afrique de l'Ouest, et son pouvoir pathogène est moindre. Le genre Lentivirus inclut également le virus de l'immunodéficience simienne (SIV), le virus de l'immunodéficience féline (FIV), le virus *Visna maedi* du mouton (VMV), le virus de l'arthrite et de l'encéphalite des caprins (CAEV), le virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV) et le virus de l'immunodéficience bovine (BIV).
La nomenclature actuelle, basée sur l'analyse phylogénétique de différentes régions génomiques, distingue 3 groupes de HIV-1 : le groupe M majoritaire comportant différents sous-types (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J et K) et différentes formes recombinantes inter sous-types (Circulating Recombinant Forms, CRF01-AE, CRF02-AG, CRF03-AB...), le groupe N et le groupe O.
Le HIV-2 comporte également différents groupes de virus (A-F).
Au-delà de l'étude des différences de distribution géographique, l'épidémiologie moléculaire vise à identifier au sein des différents groupes de virus des différences d'infectiosité, de pouvoir pathogène, de détection par les tests de laboratoire ou de

sensibilité aux antiviraux. La caractérisation moléculaire des différentes souches est également indispensable pour les approches vaccinales.
L'origine simienne des HIV semble à l'heure actuelle un fait accepté. Ainsi, un virus de l'immunodéficience simienne du chimpanzé (SIVcpz) serait à l'origine du HIV-1 alors que le virus de l'immunodéficience simienne du singe sooty mangabey (SIVsm) est impliqué dans l'origine du HIV-2. Différents facteurs politiques, économiques et sociaux ont ensuite contribué à la diffusion épidémique de ces virus.

II. Le virus

A. Structure de la particule virale

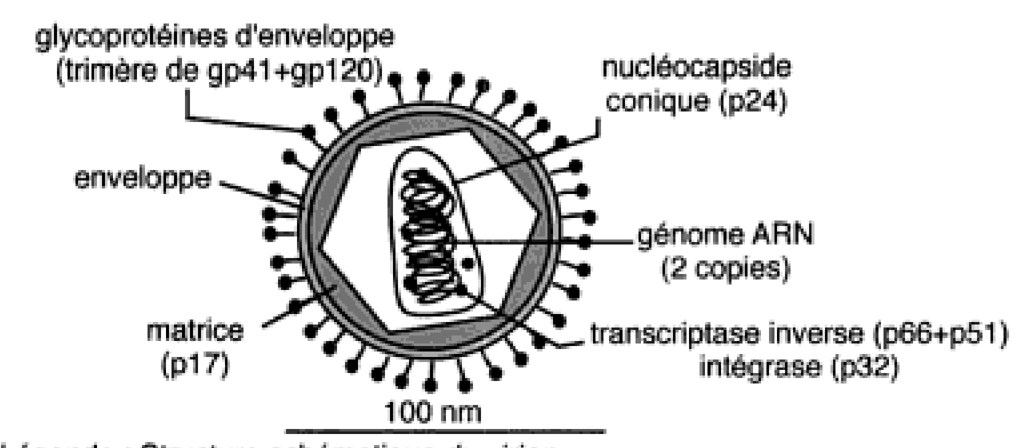


Figure 1. Structure schématique du virion

La particule virale, de forme sphérique, mesure environ 110 nanomètres de diamètre. Elle est constituée d'une enveloppe portant des protubérances et d'une partie centrale comportant une structure dense en microscopie électronique de forme conique. L'enveloppe virale est constituée d'une bicouche lipidique empruntée à la membrane cytoplasmique de la cellule hôte au sein de laquelle sont présentes des protéines cellulaires, comme des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité, et des protéines d'origine virale codées par le gène *env*. Ces dernières correspondent à la glycoprotéine de surface (SU Gp120) et à la glycoprotéine transmembranaire (TM Gp41). Elles sont synthétisées à partir d'un précurseur commun clivé par une enzyme cellulaire lors de leur transport à la surface cellulaire.
Leur organisation fonctionnelle correspond à des trimères de 2 sous-unités SU et TM. L'intérieur de la particule virale renferme des protéines codées par les gènes *gag* et *pol*, des protéines de régulation (Vpr, Vpx) et l'ARN génomique de structure dimérique. Les protéines virales matures sont pour la plupart des produits de clivage de précurseurs polyprotéiques par la protéase virale. Les protéines Gag comprennent la protéine de matrice (MA) ancrée à la face interne de la membrane par un résidu myristate, la protéine de capside (CA) et la protéine de nucléocapside (NC). Les protéines Pol sont des protéines à activité enzymatique : protéase (PR), transcriptase inverse (RT) et intégrase (IN).

B. Génome

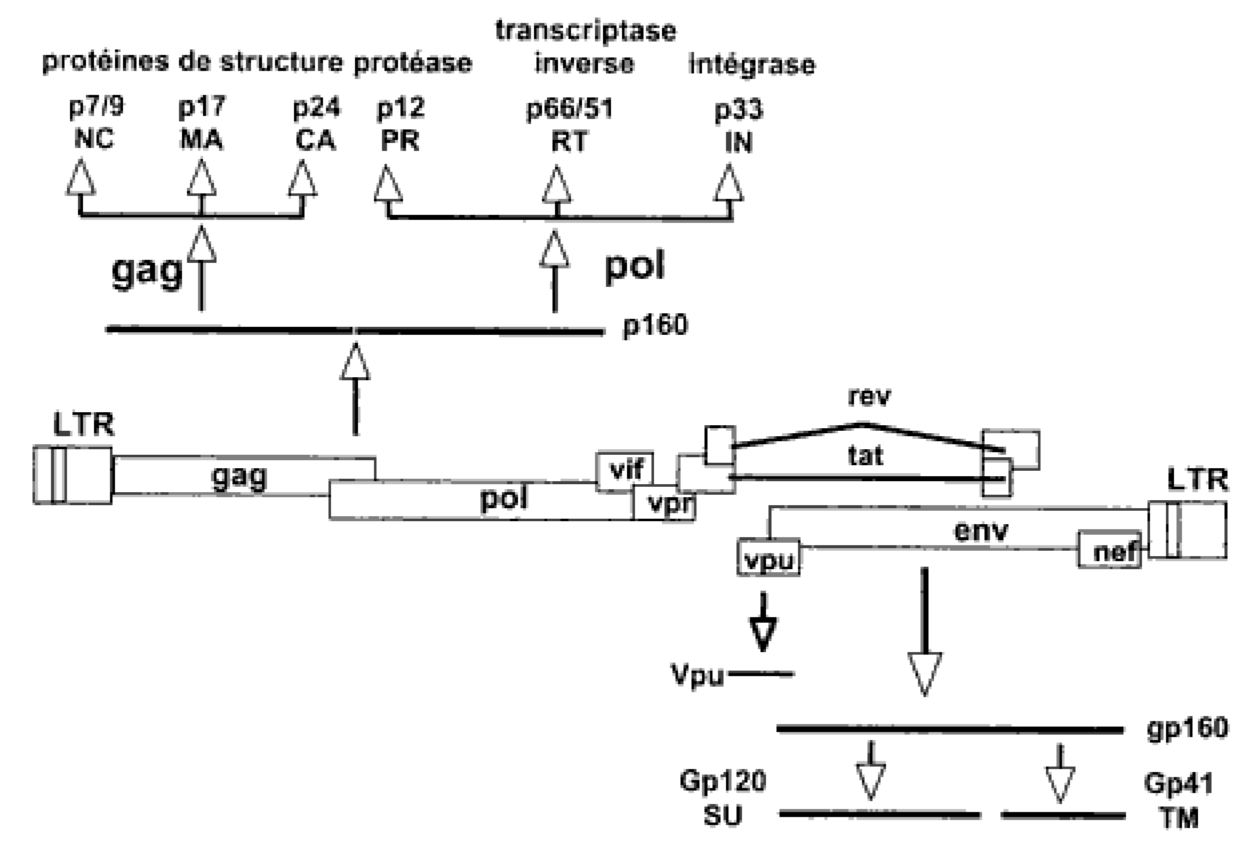


Figure 2. Génome

Le génome viral est constitué de 2 copies d'ARN simple brin d'environ 9 200 nucléotides, de polarité positive, comportant à l'extrémité 5' une coiffe M7GTP et à l'extrémité 3' une queue poly-A. Le génome est associé à une molécule spécifique d'ARN de transfert (ARNt-lys) jouant le rôle d'amorce pour l'initiation de la transcription inverse.

Les gènes du HIV sont d'une part, les gènes *gag*, *pol* et *env*, communs à tous les rétrovirus et d'autre part, les gènes auxiliaires caractéristiques des rétrovirus à génome complexe : *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu* (HIV-1) ou *vpx* (HIV-2).

Les gènes auxiliaires codent les protéines régulatrices Tat et Rev indispensables à la réplication virale et les protéines accessoires Nef, Vif, Vpr, Vpu et Vpx modulant la réplication. À chaque extrémité du génome sont localisées des séquences jouant un rôle essentiel dans la réplication. Ces séquences sont appelées : R (R pour *repeat*), courte séquence répétée à chaque extrémité ; U5 (U pour *unique*), localisée à l'extrémité 5' entre R et le site de liaison de l'ARNt lys ; PBS (*Primer Binding Site*), site d'initiation de la synthèse du brin négatif d'ADN ; U3, localisée à l'extrémité 3' entre PPT (*Polypurine Track*) et R. La séquence PPT constitue une amorce pour la synthèse du brin positif d'ADN.

Au cours de la transcription inverse U3, R et U5 sont dupliquées à l'extrémité de l'ADN pour former une structure appelée LTR (*Long Terminal Repeat*) où sont localisés des éléments de contrôle de la transcription.

C. Propriétés physico-chimiques

Comme la plupart des virus enveloppés, HIV est un virus fragile. Les produits chimiques d'inactivation recensés, dont l'efficacité demande des délais variables, sont les désinfectants à base d'aldéhyde à la concentration de 0,5 % à 2 % ; l'alcool éthylique à la concentration de 70 % ; les produits à base de phénol à 5 % ; l'hypochlorite de soude (eau de Javel) à 10 % ; les iodophores.
Pour les procédés physiques d'inactivation, après chauffage à 56 °C pendant 30 mn, l'activité du virus n'est plus détectable ; en revanche, les rayons UV sont sans effet sur le HIV, même aux doses supérieures à celles utilisées dans le laboratoire.

III. Interaction virus-cellule

Le cycle réplicatif du HIV se déroule en plusieurs étapes successives :
- reconnaissance de la cellule hôte et entrée du virus ;
- transcription inverse ;
- transport de l'ADN viral et intégration dans le génome humain ;
- transcription du provirus, transport et maturation de l'ARN ;
- traduction ;
- assemblage des différents composants du virus, bourgeonnement des virions et maturation.

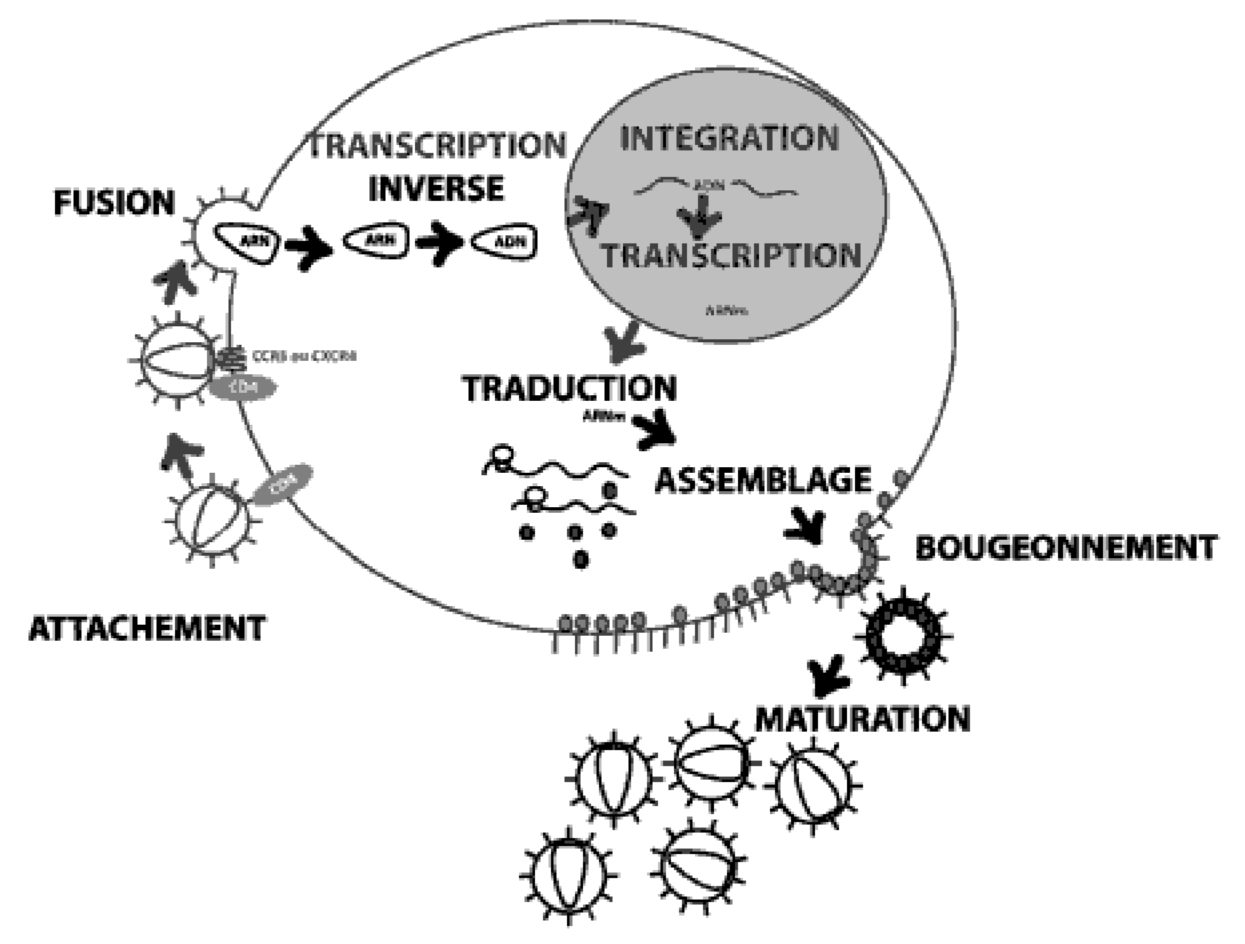


Figure 3. Les étapes successives du cycle réplicatif

La reconnaissance de la cellule-hôte fait intervenir deux types de récepteurs cellulaires. Le récepteur principal est la molécule CD4, présente à la surface des lymphocytes T auxiliaires et des cellules de la lignée monocyte-macrophage incluant les cellules dendritiques et les cellules microgliales. Le récepteur auxiliaire ou corécepteur est un récepteur de chimiokines.
Les deux principaux corécepteurs sont CCR5, dont les ligands naturels sont RANTES, MIP1-α et MIP1-β et CXCR4, dont le ligand naturel est SDF1. Selon l'utilisation préférentielle du corécepteur, les souches de HIV sont schématiquement classées en R5 (souches utilisant CCR5), X4 (souches utilisant CXCR4) ou R5X4 (souches utilisant CCR5 et CXCR4).
Les souches R5 se caractérisent par un tropisme macrophagique, la non-induction de syncitia (NSI), un faible niveau de réplication et leur présence prépondérante au stade précoce de l'infection.
Les souches X4 se caractérisent par un tropisme lymphocytaire, l'induction de syncitia (SI), un niveau élevé de réplication et leur présence, mais de manière non systématique, aux stades avancés de l'infection.
La glycoprotéine d'enveloppe SU comporte 5 domaines constants C1-C5 et 5 domaines variables V1-V5. La reconnaissance de la molécule CD4 par la glycoprotéine d'enveloppe SU fait intervenir essentiellement les domaines constants C1, C4 et C5 de la protéine SU, et le domaine extracellulaire D1 de la molécule CD4. Cette interaction entraîne un changement de conformation de la protéine SU qui stabilise un site de liaison au corécepteur impliquant la région V3. L'interaction ultérieure entre la protéine SU et le corécepteur approprié conduit à l'activation de la protéine transmembranaire TM et à la fusion entre les membranes virales et cellulaires.
Après libération dans le cytoplasme, la nucléocapside virale devient perméable à différentes molécules, en particulier aux dNTP. La transcriptase inverse (RT) initie la synthèse du brin d'ADN négatif en utilisant comme amorce l'ARNt-lys. Au cours de l'élongation, l'activité RNAse H de la RT dégrade l'ARN ayant servi de matrice. Le brin d'ADN positif est synthétisé à partir du site polypurine non dégradé de l'ARN (PPT) jouant le rôle d'amorce.
La transcription inverse aboutit à la synthèse d'un ADN double brin présentant à chacune de ses extrémités un LTR de structure U3-R-U5. La transcriptase inverse se caractérise par une faible fidélité et une faible processivité, propriétés à l'origine de la variabilité virale. Le taux d'erreur d'incorporation de nucléotide de la transcriptase inverse, estimé à 3.10^{-5}, découle de l'absence d'activité correctrice d'erreur de la RT. La possibilité de saut de la transcriptase inverse d'une matrice à une autre, combinée à la structure dimérique du génome, est à l'origine d'une fréquence élevée de recombinaisons.
L'intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte nécessite le transport du complexe de préintégration à l'intérieur du noyau.
Comme pour tous les Lentivirus, ce transport dans le noyau est un processus actif. Celui-ci fait intervenir la protéine Vpr du HIV-1 et la protéine Vpx du HIV-2. L'intégration de l'ADN viral comporte différentes étapes avec élimination par l'intégrase de 2 bases à l'extrémité de chaque LTR. L'absence de mécanisme viral ou cellulaire susceptible d'éliminer le provirus fait de l'intégration une caractéristique essentielle des rétrovirus pour la persistance dans l'organisme hôte.

La transcription des gènes viraux après intégration s'effectue grâce à la machinerie cellulaire. La régulation de la transcription est sous la dépendance de facteurs cellulaires et de facteurs viraux. Les facteurs cellulaires, notamment NF-KB, interagissent avec des séquences régulatrices localisées au niveau de la région U3 du LTR5'. La protéine Tat du HIV est une protéine transactivatrice. Elle interagit avec la séquence TAR, ce qui permet le recrutement de différents facteurs cellulaires. Cela conduit à la phosphorylation de l'ARN polymérase cellulaire et à l'augmentation de sa processivité.
Les ARN nouvellement synthétisés sont modifiés avant d'être utilisés comme génomes ou ARN messagers. Ils sont dotés d'une coiffe en 5', polyadénylés en 3', et épissés. La protéine Rev interagit avec la séquence RRE localisée dans la région *env* et facilite le transport dans le cytoplasme des ARN non épissés, nécessaires à la synthèse des précurseurs Gap-Pol et à la production de génomes viraux.
Les ARN complets sont traduits au niveau des ribosomes en protéines précurseurs Gag et Gag-Pol (ratio 20 : 1). Les précurseurs Gag sont myristylés afin de permettre l'ancrage dans la face interne de la membrane cellulaire, et phosphorylés. Les protéines précurseurs Env contiennent un peptide signal à leur extrémité N-terminale assurant leur translocation à la surface interne du réticulum endoplasmique. Après clivage du peptide signal par une enzyme cellulaire, la protéine est transportée vers la surface cellulaire par le système membranaire. Dans l'appareil de Golgi, elle est modifiée par glycosylation et clivée par une protéase cellulaire en deux sous-unités fonctionnelles SU et TM.
Le bourgeonnement s'effectue par l'association simultanée d'ARN génomiques, des protéines précurseurs Gag et Gag-Pol, et de la membrane cellulaire. Plusieurs protéines accessoires semblent intervenir à ce niveau (Vif, Vpr, Vpu et Nef). Les ARN complets porteurs de la séquence Psi (signal d'encapsidation) se dimérisent et sont incorporés grâce à l'affinité de la NC pour les ARN. La maturation de la particule nécessite le clivage protéolytique des précurseurs Gag et Gag-Pol par la protéase virale. La particule virale est alors infectieuse, capable d'infecter une nouvelle cellule.

IV. Interaction virus-organisme

A. Histoire naturelle

L'infection se caractérise par la succession de trois phases : la primo-infection, la phase asymptomatique et la phase symptomatique.

- La primo-infection peut être symptomatique, avec une angine, rappelant une mononucléose infectieuse (syndrome mononucléosique sanguin) et parfois un syndrome méningé, ou asymptomatique. Elle correspond à une dissémination virale rapide et étendue, suivie d'une réponse immunitaire spécifique, cellulaire et humorale, variable d'un individu à l'autre.
  Dans la situation la plus fréquente d'une transmission sexuelle, les cellules dendritiques de la muqueuse génitale véhiculent le virus par l'intermédiaire d'un

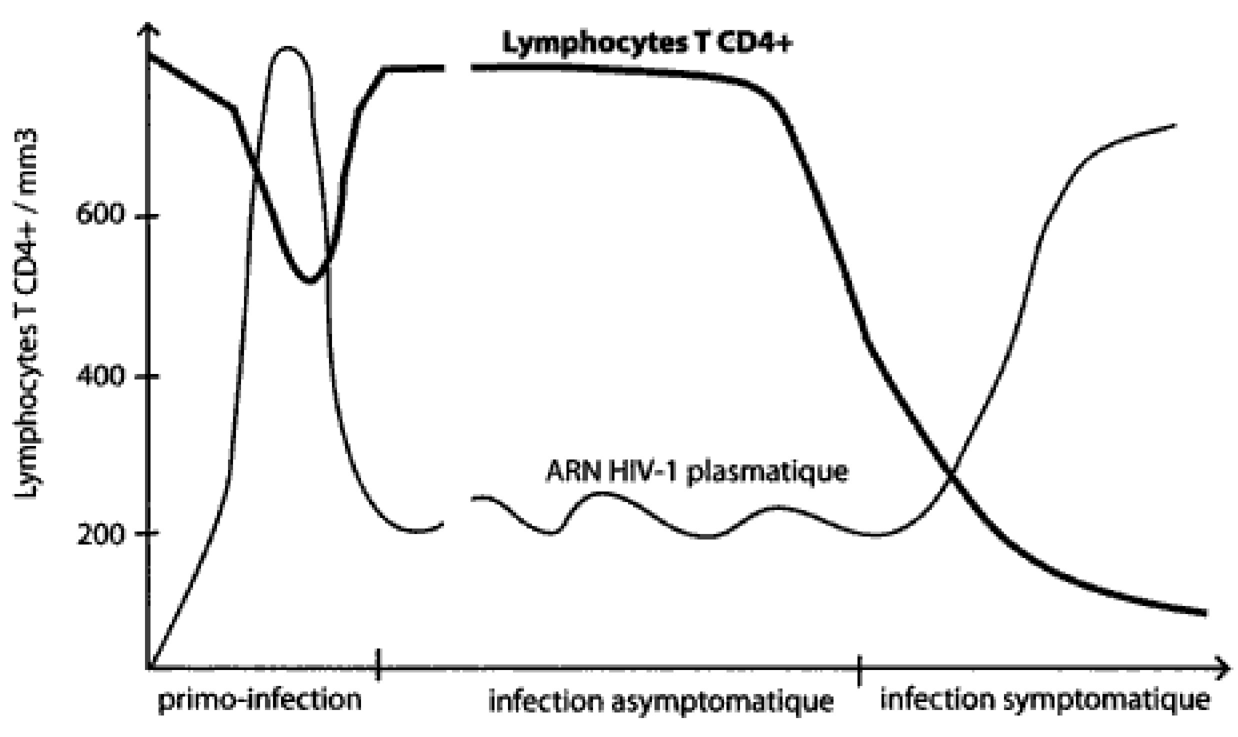


Figure 4. Les 3 phases de l'infection

récepteur membranaire appelé DC-SIGN dans les ganglions lymphatiques régionaux. Le virus est ensuite transmis aux lymphocytes T CD4 + activés dont l'infection est le point de départ d'une importante virémie assurant la dissémination du virus à la plupart des organes dans les jours suivants (*fig. 5*). Une des caractéristiques de la population virale initiale est sa relative homogénéité. Dans les semaines qui suivent, la virémie diminue et se stabilise en 6 mois environ. Le contrôle de la virémie semble être dû principalement à la réponse lymphocytaire T cytotoxique.

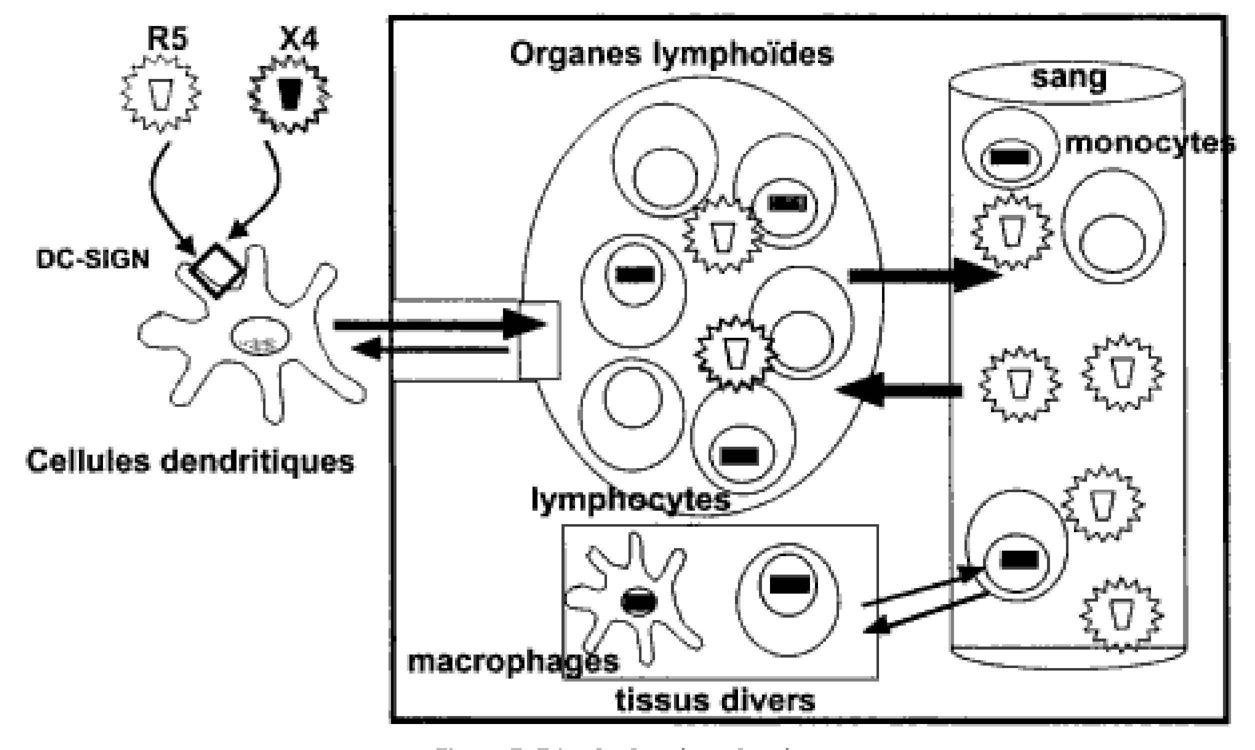


Figure 5. Dissémination du virus

- La phase asymptomatique, ou phase de latence clinique, se caractérise par une durée médiane en l'absence de traitement d'environ 10 ans. Les variations entre les individus sont toutefois considérables, de 2 à plus de 20 ans. Grâce aux avancées technologiques permettant la quantification de l'ARN génomique associé aux particules virales, des études de cohorte ont montré que la concentration plasmatique d'ARN viral influençait la durée de la période asymptomatique et constituait donc un marqueur essentiel de progression clinique.
  Pendant la phase asymptomatique, les lymphocytes T CD4 + présentent des anomalies qualitatives et quantitatives avec une diminution régulière de leur nombre au cours du temps. Ce déclin concerne le compartiment des lymphocytes T CD4 + mémoires et celui des lymphocytes T CD4 + naïfs. Les lymphocytes T CD8 + mémoires et naïfs diminuent également.
  La conséquence est une restriction du répertoire des cellules T. La décroissance régulière du nombre de lymphocytes T CD4 + dans le sang périphérique au cours de l'évolution de l'infection relève de différents mécanismes : destruction cellulaire par apoptose induite par le virus ou la réponse immunitaire, déficit de régénération des lymphocytes, modification de la distribution des lymphocytes dans les différents compartiments de l'organisme.
- La phase symptomatique de l'infection se caractérise sur le plan biologique par une élévation de la virémie et une chute importante du nombre de lymphocytes T CD4 +.

Sur le plan clinique, la survenue d'infections opportunistes et de néoplasies définit la maladie Sida.

B. Classification de l'infection

La classification du CDC proposée en 1993 distingue 3 catégories A, B et C (*tab. 1*). Ces catégories sont subdivisées en 3 sous-catégories (1, 2 et 3) selon la valeur des lymphocytes T CD4 + (*tab.* 2). Aux USA, le Sida est défini par les catégories A3, B3 ou C alors qu'en Europe, seule la catégorie C définit le Sida. Une classification pédiatrique, concernant les enfants de moins de 12 ans, a été proposée par le CDC d'Atlanta en 1994. Elle prend en compte des critères cliniques couplés au taux de lymphocytes T CD4 + en fonction de l'âge (exprimé en nombre absolu et en pourcentage).
La classification clinique différencie 4 catégories : N, asymptomatique ; À, symptômes mineurs ;
B, symptômes modérés et C, symptômes sévères.
La classification immunologique comporte 3 catégories : I, pas de déficit immunitaire ; II, déficit modéré et III, déficit sévère.

Tableau 1. Catégories cliniques de la classification du CDC (1993)

Catégorie A	Catégorie B	Catégorie C
Un ou plusieurs des critères listés ci-dessous chez un adulte ou un adolescent infectés par le HIV, s'il n'existe aucun des critères des catégories B et C : – infection HIV asymptomatique ; – lymphadénopathie persistante généralisée ; – primo-infection symptomatique.	Manifestations cliniques chez un adulte ou un adolescent infectés par le HIV, ne faisant pas partie de la catégorie C et répondant au moins à l'une des conditions suivantes : – angiomatose bacillaire ; – candidose oropharyngée ; – candidose vaginale persistante, fréquente ou qui répond mal au traitement ; – dysplasie du col (modérée ou grave), carcinome in situ ; – syndrome constitutionnel : fièvre (≥ 38,5 °C) ou durée de diarrhée supérieure à 1 mois ; – leucoplasie chevelue de la langue ; – zona récurrent ou envahissant plus d'un dermatome ; – purpura thrombocytopénique idiopathique ; – salpingite, en particulier lors de complications par des abcès tubo-ovariens ; – neuropathie périphérique. Cette catégorie est hiérarchique, c'est-à-dire qu'un sujet classé dans la catégorie B ne peut passer dans la catégorie A lorsque les signes cliniques ont disparu.	Cette catégorie correspond à la définition du Sida chez l'adulte. Lorsqu'un sujet a présenté une des pathologies de cette liste, il est classé définitivement dans la catégorie C : – candidose bronchique, trachéale ou pulmonaire ; – candidose œsophagienne ; – cancer invasif du col* ; – coccidioïdomycose, disséminée ou extrapulmonaire ; – cryptococcose extrapulmonaire ; – cryptosporidiose intestinale de durée supérieure à 1 mois ; – infection à CMV (autre foie, rate ou ganglions) ; – rétinite à CMV (avec altération de la vision) ; – encéphalopathie due au HIV ; – infection herpétique, ulcères chroniques de durée supérieure à 1 mois, infection bronchique, pulmonaire ou œsophagienne ; – histoplasmose disséminée ou extrapulmonaire ; – isosporidiose intestinale chronique (durée supérieure à 1 mois) ; – sarcome de Kaposi ; – lymphome de Burkitt ; – lymphome immunoblastique ; – lymphome cérébral primaire ; – infection à *Mycobacterium avium* ou *kansasii*, disséminée ou extrapulmonaire ; – infection à *Mycobacterium tuberculosis*, quel que soit le site (pulmonaire* ou extrapulmonaire) ; – infection à mycobactérie, identifiée ou non, disséminée ou extrapulmonaire ; – pneumopathie bactérienne récurrente* ; – pneumopathie à *Pneumocystis jiroveci* ; – leuco-encéphélopathie multifocale progressive ; – septicémie à salmonelle non typhi récurrente ; – toxoplasmose cérébrale ; – syndrome cachectique dû au HIV.

* Nouvelles pathologies ajoutées en 1993.

Tableau 2. Classification de l'infection à HIV pour les adultes et les adolescents

Nombre de lymphocytes T CD4 +	(A) Asymptomatique, primo-infection ou lymphadénopathie persistante généralisée	(B) Symptomatique, sans critères (A) ou (C)	(C) Sida
≥ 500/mm^3	A1	B1	C1
200 à 499/mm^3	A2	B2	C2
< 200/mm^3	A3	B3	C3

Définition du Sida en Europe en 1993 (C1, C2, C3).
Définition du Sida CDC aux États-Unis en 1993 (A3, B3, C1, C3).
Correspondance entre valeur absolue et pourcentage des lymphocytes T CD4 + :
CD4 + ≥ 500/mm^3 : ≥ 29 %
CD4 + 200 à 499/mm^3 : 14 à 28 %
CD4 + < 200/mm^3 : < 14 %

V. Épidémiologie

A. Modes de contamination

1. La transmission sexuelle

Elle est actuellement majoritaire (80 % des cas). Le virus est présent dans le sperme et les sécrétions cervicovaginales. Certains types de rapports sexuels présentent un risque accru (anal > vaginal > buccal). Les rapports violents avec saignement ou pendant les règles sont associés à un risque plus élevé.

2. La transmission par le sang

Elle est liée historiquement à la transfusion sanguine et à l'utilisation de facteurs antihémophiliques. Actuellement, elle concerne surtout les sujets pratiquant la toxicomanie par voie intraveineuse ou artérielle, mais aussi à un degré bien moindre les personnels soignants après accidents d'exposition au sang.

3. La transmission mère-enfant

Les mères infectées peuvent contaminer leurs enfants. En l'absence de mesures préventives, 20 à 30 % des nouveau-nés sont contaminés. Cette contamination survient le plus souvent à proximité de l'accouchement par exposition de l'enfant au sang ou aux sécrétions génitales de la mère. L'allaitement maternel est également une source de contamination du nourrisson.

Le risque de contamination dépend de la voie d'inoculation, du volume de l'inoculum viral, du virus, mais aussi du terrain génétique de l'hôte. Certains individus sont en effet partiellement protégés du fait de l'absence d'expression de certains récepteurs (CCR5 par exemple).

B. Épidémiologie dans le monde et en France

En 2005 (source ONU-Sida), plus de 38 millions d'individus (entre 33 et 46) sont infectés par le HIV et plus de 95 % de ces derniers vivent dans les pays en voie de développement (Afrique subsaharienne et Asie du Sud-Est principalement). La prévalence de l'infection à HIV-1 peut aller jusqu'à 34 % dans certains pays d'Afrique (en moyenne 6 %). Un nombre important de nouveaux cas de transmission a été noté dans les nouveaux États indépendants de l'ancienne Union Soviétique chez les usagers de drogues. Bien que la stabilisation de l'incidence soit vraisemblable dans les pays industrialisés, un relâchement des comportements de prévention a parfois été observé.

En France, environ 100 000 personnes seraient infectées et plus de 50 000 sont mortes du Sida. En 2004, on estime que 7 000 sujets ont été nouvellement contaminés, essentiellement par voie hétérosexuelle. L'infection à HIV est à déclaration obligatoire et anonyme en France depuis 2003, auparavant seuls les cas de Sida l'étaient.

VI. Diagnostic et suivi de l'infection

A. Diagnostic biologique

Le dépistage de l'infection est proposé chez les personnes s'estimant ponctuellement ou durablement à risque de contamination, chez les patients présentant des signes de primo-infection ou chez les patients présentant des pathologies pouvant être des complications de l'infection à HIV. Il est également proposé en cas d'incarcération, en préopératoire, en prénuptial et lors de la déclaration de grossesse. Le dépistage de l'infection à HIV est également un acte de prévention puisqu'il permet une discussion avec le patient sur ces facteurs de risques d'infection et sur les moyens de prévention. Le dépistage HIV ne peut être prescrit sans l'accord du sujet.

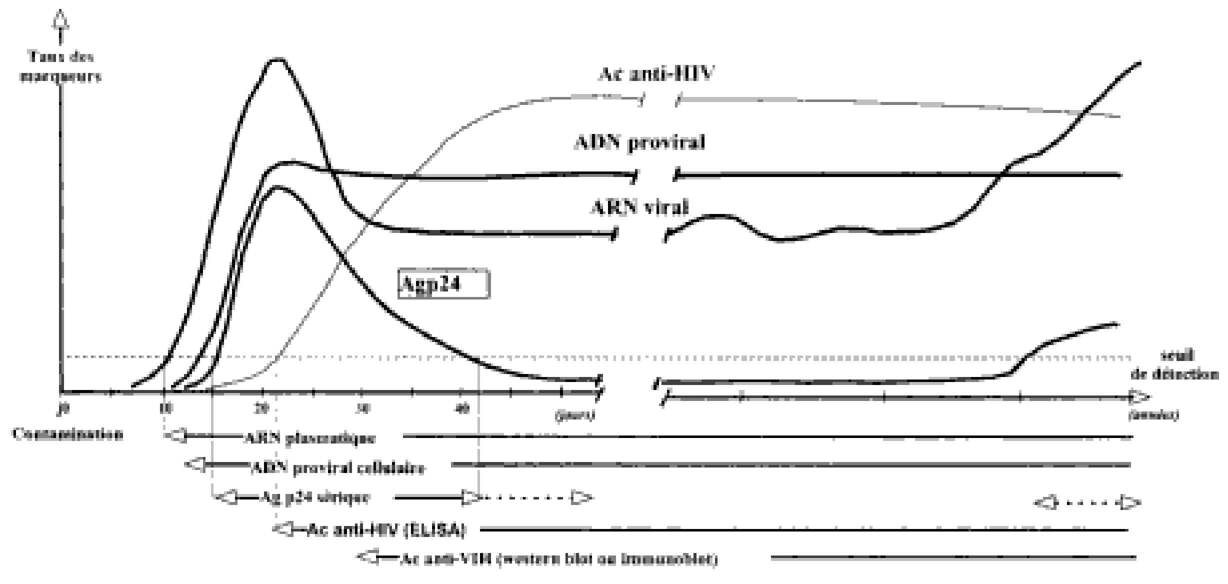


Figure 6. Diagnostic biologique

1. Tests de dépistage sérologique

Ils reposent sur la recherche d'anticorps spécifiques du HIV dans le sérum par l'utilisation de tests Elisa agréés. Deux tests différents sont systématiquement réalisés. Ils doivent détecter les anticorps anti-HIV-1 et anti-HIV-2. Ils sont très sensibles et se positivent en moyenne vers le 21[e] jour après la contamination. Des positivations tardives sont possibles, le dépistage devra donc être systématiquement contrôlé 3 mois après une exposition.

2. Test de confirmation sérologique

Lorsque les deux tests réalisés lors du dépistage ne sont pas négatifs, un western-blot ou un immunoblot doit être réalisé sur cet échantillon et un second prélèvement est nécessaire pour confirmer l'identité du patient et la spécificité des anticorps détectés. Il existe en effet des réactions faussement positives. Western-blot ou immunoblot permettent d'identifier les différentes protéines virales cibles des anticorps du sujet et de différencier le HIV-1 du HIV-2. Lorsque au moins deux protéines d'enveloppe Env ± Gag ± Pol sont reconnues, l'examen est positif et le sujet séropositif pour le HIV.

3. Tests de diagnostic direct

L'utilisation de marqueurs mettant en évidence un des composants de la particule virale peut être nécessaire lorsque le sujet n'a pas encore développé d'anticorps (fenêtre sérologique), lorsque les tests sérologiques restent indéterminés et lorsque la présence d'anticorps maternels masque une éventuelle infection du nouveau-né. On réalise alors la recherche du génome viral (ARN par RT-PCR) ou à défaut la recherche de l'antigène p24. Elles sont respectivement positives après 10 et 15 jours. L'antigène p24 devient négatif quelques semaines après la primo-infection. D'autres examens spécialisés peuvent être nécessaires dans certains cas : recherche d'ADN proviral par PCR, isolement viral par culture…

4. Autres examens

Un bilan biologique (populations lymphocytaires, dépistages HCV, HBV, CMV, HTLV, toxoplasmose), une IDR à la tuberculine, une radiographie pulmonaire et un examen clinique complet permettent l'évaluation initiale de l'infection.

B. Suivi biologique de l'infection à HIV

Outre l'interrogatoire et l'examen clinique, deux examens biologiques permettent d'établir en première intention le pronostic et le suivi de l'infection à HIV : la détermination du taux de lymphocytes T CD4 + et la quantification de l'ARN. Ces deux marqueurs sont étudiés tous les 3 mois. Leur évolution constitue un élément important pour l'instauration ou la modification d'un traitement.

Le taux de lymphocytes T CD4 + est exprimé en nombre par mm^3 (la normale est de 500 à 2 000) ou en pourcentage. Ce taux reflète l'immunodépression du sujet et donc le risque de développer des pathologies opportunistes. Ce risque est important au-dessous de 200 T CD4 +/mm^3 et majeur au-dessous de 50 T CD4 +/mm^3. Il va conditionner la mise en place d'un traitement de l'infection à HIV (seuil à 350 lymphocytes T CD4 +/mm^3) ainsi que le traitement préventif des infections opportunistes.

La quantification de l'ARN plasmatique du HIV-1 est réalisée grâce à des techniques standardisées (RT-PCR, NASBA ADN branché). La quantité d'ARN du HIV-1 est exprimée en copies par mL de plasma sanguin (ou en Log copies/mL). Ces techniques sont très sensibles et peuvent détecter moins de 50 copies d'ARN. La charge virale plasmatique, qui correspond à l'équilibre entre la production de virions et leur destruction par le système immunitaire, reflète le niveau de la réplication virale. Plus la réplication est importante, plus le risque de progression de l'infection est élevé. La charge virale plasmatique est un paramètre de choix pour évaluer l'efficacité des antirétroviraux qui agissent directement en inhibant la réplication du virus.

En seconde intention, deux autres examens biologiques sont utilisés en cas de réponse thérapeutique non-optimale ou d'échecs thérapeutiques répétés. Il s'agit de la détermination du génotype de résistance du HIV-1 et du dosage des antirétroviraux.

Le génotype de résistance permet de mettre en évidence, sur les gènes de la transcriptase inverse et de la protéase, la présence de mutations associées à la résistance aux antirétroviraux. Elles apparaissent lorsque la réplication virale persiste sous traitement. Il est réalisé par séquençage des gènes concernés après amplification

par RT-PCR à partir des virions présents dans le plasma sanguin. Ces tests sont actuellement utilisés à des fins épidémiologiques et d'adaptations thérapeutiques. Le dosage des antirétroviraux concerne essentiellement les inhibiteurs de la protéase et les inhibiteurs non-nucléosidiques de la RT. Les dosages sont réalisés sur sérum par HPLC au pic et à la vallée. Ils permettent d'adapter la posologie dans des situations d'efficacité non optimale ou de toxicité des molécules.

VII. Traitement

A. Les antirétroviraux

Les inhibiteurs nucléosidiques et non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI et INNTI) et les inhibiteurs de la protéase (IP) constituent les 3 principales classes thérapeutiques (*fig. 7*). Les inhibiteurs d'entrée (inhibiteur de fusion, antagonistes de corécepteurs) et les inhibiteurs de l'intégrase constituent deux nouvelles classes.
Les INTI (AZT, zidovudine ; d4T, stavudine ; ddI, didanosine ; ddC, zalcitabine ; 3TC, lamivudine ; ABC, abacavir ; EMC, emtricitabine et TDF, ténofovir) doivent être transformés en dérivés triphosphates par des kinases cellulaires pour exercer leur activité.
Les INNTI (NVP, névirapine ; EFV, éfavirenz ; DLV, delavirdine) et les IP (SQV, saquinavir ; RTV, ritonavir ; IDV, indinavir ; NFV, nelfinavir ; APV, amprénavir ; LPV, lopinavir ; fos APV, fosamprénavir ; ATV, atazanavir ; TPV, tipranavir ; DRV, darunavir) sont directement actifs. La plupart des IP sont actuellement utilisés en association avec du ritonavir qui améliore leur pharmacocinétique en ralentissant, par compétition, leur métabolisation par le CYP3A4. Les inhibiteurs de la fusion (enfuvirtide ou T20) bloquent l'entrée du VIH dans la cellule par interaction avec la gp41. Du fait de leur nature peptidique, les inhibiteurs de la fusion sont les seuls antirétroviraux disponibles par voie injectable sous-cutanée. Les antagonistes de CCR5 comme le maraviroc bloquent eux aussi l'entrée du VIH mais sont administrés *per os*. Le raltegravir, disponible depuis 2007, et un antirétroviral puissant inhibant l'intégrase du VIH.
Différentes combinaisons comportant au moins 3 molécules peuvent être utilisées (2 INTI + 1 IP ; 2 INTI + 1 INNTI ; 3 INTI). Les stratégies de prise en charge thérapeutique dans les différentes situations cliniques (traitement de première intention, traitement de relais, primo-infection, prophylaxie post-exposition) font l'objet de recommandations nationales par des groupes d'experts. Ces recommandations sont régulièrement actualisées.
La décision d'instaurer un traitement antirétroviral doit prendre en considération le statut clinique et immuno-virologique du patient mais aussi les limites des traitements actuels : absence d'éradication virale, effets indésirables à court terme (troubles digestifs fréquents) et à moyen terme (troubles métaboliques, syndrome lipodystrophique), difficultés d'adhésion sur une longue période en raison de contraintes multiples (nombre de prises, contraintes alimentaires…) et interactions médicamenteuses. Le traitement est recommandé pour les patients cliniquement symptomatiques ou lorsque le nombre de lymphocytes T CD4 + est inférieur à $350/mm^3$.
Une fois instauré, le traitement doit avoir pour objectif une inhibition maximale de la réplication virale pour éviter le développement de résistance. La probabilité d'émer-

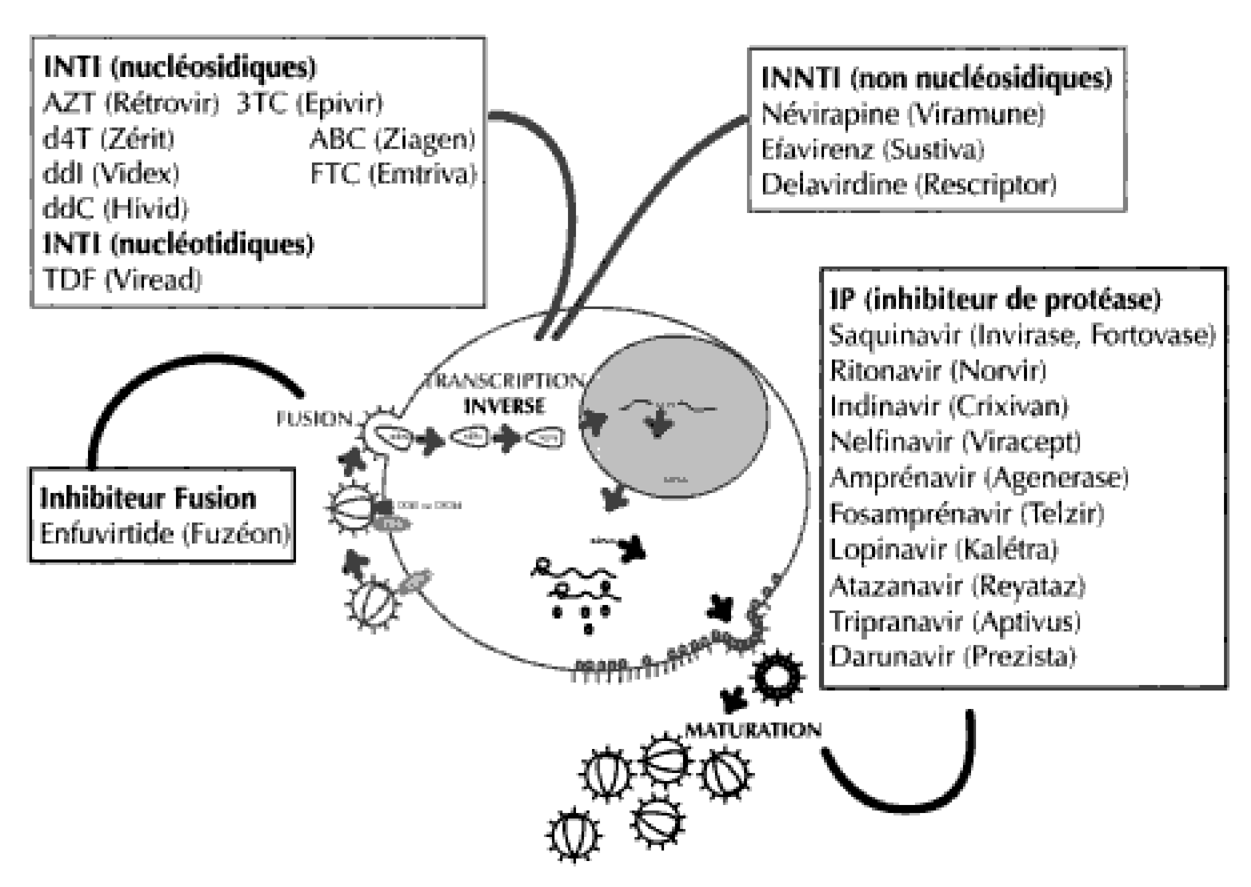


Figure 7. Les 3 principales classes thérapeutiques

gence de virus résistants en fonction de l'activité antivirale du traitement peut être modélisée par une courbe en cloche *(fig. 8)*. Lorsque la virémie sous traitement est maintenue en dessous du seuil de détection des tests moléculaires, la probabilité d'émergence de résistance est pratiquement nulle. Dans le cas contraire, il existe un déterminisme remarquable d'évolution vers la résistance qui sera plus ou moins rapide selon les molécules utilisées (INNTI et 3TC > INTI et IP). Il importe enfin de souligner la résistance croisée pour les différentes molécules au sein de chaque classe.

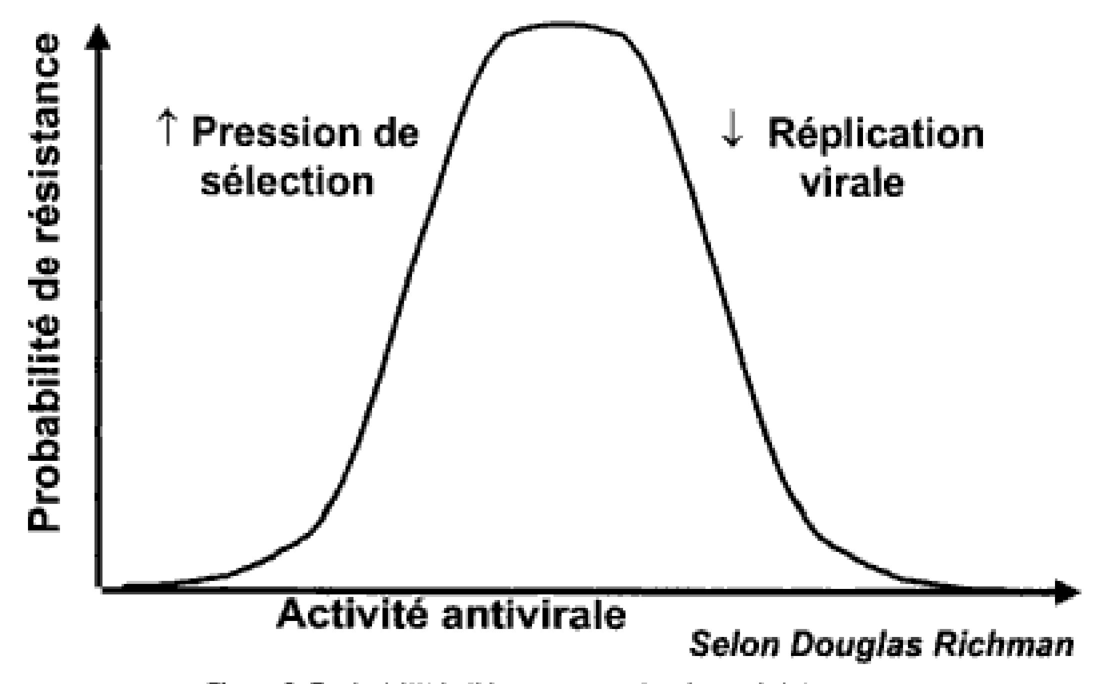


Figure 8. Probabilité d'émergence de virus résistants

B. Traitement et prévention des infections opportunistes

La survenue des infections opportunistes a considérablement diminué depuis 1996 grâce à la restauration immunitaire induite par les multithérapies antirétrovirales puissantes. Les modalités de prise en charge après l'identification de l'agent en cause sont résumées dans le *tableau 3*.

La prévention des infections opportunistes repose sur un traitement. La prévention primaire dépend du nombre de lymphocytes T CD4 + (*tab. 4*). La prévention secondaire vise à prévenir les rechutes. La restauration immunitaire sous traitement antirétroviral permet dans certaines circonstances de suspendre la prophylaxie primaire ou secondaire.

Tableau 3. Dose quotidienne pour le traitement des infections opportunistes, parasitaires, fongiques et bactériennes

	Traitement	Alternative	Autres
	Parasites		
Pneumocystis jiroveci	Triméthoprime (20 mg/kg) + sulfaméthoxazole	Pentamidine IV (3 mg/kg) Pentamidine aérosol (300 mg)	Triméthoprime (20 mg/kg/j) + dapsone (100 mg)
		Trimétrexate IV (45 mg) Atovaquone (750 mg x 3)	Éflornithine (400 mg)
Toxoplasma gondii	Pyriméthamine (50 mg) + sulfadiazine (4 g) + acide folinique (20 mg)	Pyriméthamine (50 mg) + clindamycine (2,4 à 3,6 g) Atovaquone (750 mg x 4)	Trimétrexate
Isospora belli	Triméthoprime (7 mg/kg) + sulfaméthoxazole	Pyriméthamine (50 mg)	
Cryptosporidia	Nitrazoxamide (2 g/j)		Paromomycine (3 g) Azithromycine (600 mg/j)
Microsporidies	Albendazole (400 mg)	Fumagilline (Bienusi)	Métronidazole
Mycoses			
Cryptococcus neoformans	Amphotéricine B (0,7 mg/kg)	Fluconazole (400 mg)	Flucytosine (25 mg/kg x 4)
Candida (muqueuses)	Amphotéricine B (locale) Nystatine (locale)	Fluconazole (50 mg) Kétoconazole (200 mg) Itraconazole (200 mg)	
	Bactéries		
Mycobacterium tuberculosis	Isoniazide (5 mg/kg) Rifampicine (10 mg/kg) Éthambutol (15 mg/kg) Pyrazinamide (25 mg/kg)	Streptomycine (1 g) Amikacine (15 mg/kg)	
Mycobactérie atypique	Ansamycine (300 mg) Clarithromycine (1 g) Éthambutol (20 mg/kg)	Amikacine (15 mg/kg) Ciprofloxacine (750 mg x 2) Azithromycine (600 mg)	Clofazimine (100 mg)
Salmonelles	Ciprofloxacine (750 g x 2)	Azithromycine (900 mg)	Ceftriaxone Céfotaxime Ampicilline
	Virus		
CMV	Ganciclovir (10 mg/kg) Foscarnet (90 mg/kg x 2)	Cidofovir (5 mg/kg/semaine)	
Herpes simplex virus	Aciclovir (15 mg/kg)	Famciclovir (250 mg x 3) Valaciclovir (1 g x 2)	
Herpes zoster	Aciclovir (45 mg/kg)	Valaciclovir (1 g x 3)	Foscarnet (60 mg x 2)

Tableau 4. Prévention primaire des infections opportunistes chez les personnes infectées par le HIV

Infection	Indication	Traitement	
		Premier choix	Alternative
Parasites			
Pneumocystose	CD4 < 200/mm³ ou 15 % Chimiothérapie	TMP-SMZ 160/800 mg/j	TMP-SMZ 80/100 mg/j TMP-SMZ 160/800 mg/2 J Dapsone 100 mg/j Dapsone 100 mg/j + pyriméthamine 50 mg/j à 50 mg/semaine + acide folinique 50 mg/semaine Pentamidine en aérosol (Respigard*) 300 mg/mois
Toxoplasmose	Ac. IgG antitoxoplasmose* CD4 < 150/mm³	TMP-SMZ 160/800 mg/j 1) Rifabutine 300 mg/j	Pyriméthamine 50 mg/semaine + dapsone 50 mg/j + acide folinique 50 mg/semaine Atovaquone 1 500 mg/j
Bactéries			
Mycobacterium avium	CD4 < 75/mm³	1) 2) Rifabutine 300 mg/j 3) Rifabutine 200 mg/j + azithromycine 1 200 mg/semaine	1) 2) Azithromycine 1 200 mg/semaine 3) Clarithromycine 500 mg 2 fois/j
Tuberculose	Facteurs de risque	Isoniazide 300 mg/j 9 mois + pyridoxine Rifamycine 600 mg/j+ pyrizinamide 20 mg/kg/j 2 mois	Rifabutine 300 mg/j + pyrizinamide 1 500 mg/j 12 mois
Virus			
CMV	CD4 < 50/mm³ et IgG anti-CMV*	Ganciclovir oral 1 g 3 fois/j	
Zona	Contact avec patient ayant varicelle ou zona	Immunoglobuline spécifique entre 48 et 72 heures après le contact	Aciclovir 800 mg 5 fois/j entre 15 jours et 3 semaines

* Nouvelles pathologies ajoutées en 1993.

VIII. Prévention

Des moyens de prévention permettent de bloquer la transmission du HIV par les trois modes de contamination habituels.

- Transmission sanguine : la sélection des donneurs et le dépistage sérologique des dons de sang instaurés en 1985 ont permis de réduire très fortement le taux de transmission par transfusion. Depuis 2000, un dépistage systématique de l'ARN du HIV est également réalisé afin de réduire le risque résiduel. Le dépistage des anticorps anti-HIV chez les donneurs d'organes, de tissus et de cellules, est également obligatoire. Les systèmes d'échange de seringues et la vente libre des seringues ont pour but de diminuer la transmission chez les toxicomanes. En cas d'exposition au sang (AES), un traitement antirétroviral très précoce et poursuivi pendant 1 mois permet de réduire le risque de contamination.

- Transmission sexuelle : l'usage du préservatif constitue le moyen de prévention le plus efficace. Le préservatif peut être masculin ou féminin. Il doit être correctement utilisé. En cas de rupture de préservatif, une chimioprophylaxie similaire à celle d'une exposition au sang peut être proposée.
- Transmission mère-enfant : le traitement par la zidovudine (AZT) en fin de grossesse, pendant l'accouchement et les 6 premières semaines de vie de l'enfant, permet de réduire de 25 % à 8 % le taux de transmission. L'association d'une césarienne programmée ou d'autres antirétroviraux permettent de limiter ce taux à moins de 2 %. L'allaitement est contre-indiqué dans les pays industrialisés.

Conclusion

L'impact économique et social de l'infection par HIV est considérable dans toutes les régions du monde. Dans les pays industrialisés où les traitements sont accessibles, une diminution de près de 80 % de la morbidité et de la mortalité associées à l'infection a été observée depuis 1996. Cependant, il n'est pas possible d'obtenir l'éradication du virus d'un organisme infecté. Dès lors, l'utilisation des antirétroviraux semble ne pouvoir se concevoir que d'une manière illimitée et entachée de deux écueils majeurs : la toxicité et le risque d'émergence de résistance si la réplication virale n'est pas suffisamment contrôlée.
Les moyens pour combattre l'infection dans les pays démunis restent très limités. L'extrême variabilité génétique du virus constitue un obstacle majeur pour le développement d'un vaccin efficace. Si les efforts de prévention dans ces pays regroupant 95 % des infections dans le monde doivent être maintenus, le problème de l'accessibilité aux médicaments antirétroviraux et à de véritables structures de soins est désormais posé.
Les principales orientations de recherche concernent une meilleure compréhension des mécanismes de persistance virale et de restauration immunitaire, la réalisation d'essais thérapeutiques visant à évaluer des traitements simplifiés et/ou présentant une toxicité limitée, la réalisation d'essais d'immunothérapie, la mise au point éventuelle d'un vaccin préventif.

L'essentiel de la question

L'identification du syndrome d'immunodéficience acquise (Sida) en 1981 a été rapidement suivie par la découverte en 1983 de l'agent causal, le virus de l'immunodéficience humaine (HIV). L'impact économique et social de cette infection est considérable dans toutes les régions du monde et plus particulièrement dans les pays démunis, comme l'Afrique subsaharienne, n'ayant pas bénéficié des avancées thérapeutiques disponibles depuis 1996 dans les pays industrialisés.

Le HIV appartient à la famille des *Retroviridae* et au genre Lentivirus comportant 2 espèces infectant l'homme : HIV-1 et HIV-2. HIV-1 est le virus le plus répandu dans le monde. HIV-2 présente une distribution géographique plus limitée et un pouvoir pathogène moindre.

Le HIV se caractérise par une très grande variabilité génétique. La nomenclature actuelle basée sur l'analyse phylogénétique de différentes régions génomiques distingue 3 groupes de HIV-1 : le groupe M (majoritaire) comportant différents sous-types, le groupe O et le groupe N.

La particule virale, de forme sphérique, mesure 110 nanomètres de diamètre. L'enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique empruntée à la membrane de la cellule hôte et de glycoprotéines d'origine virale : la glycoprotéine de surface (SU) et la glycoprotéine transmembranaire (TM) organisées en trimères SU-TM. La reconnaissance de la cellule hôte fait intervenir 2 types de récepteurs cellulaires.

Le récepteur principal est la molécule CD4 présente à la surface des lymphocytes T auxiliaires et des cellules de la lignée monocyte-macrophage. Le récepteur auxiliaire ou corécepteur est un récepteur de chimiokines : CCR5 ou CXCR4.

L'affinité du virus pour ces récepteurs définit les souches R5, X4 ou R5X4. L'infection par le HIV au sein de l'organisme se caractérise par une intense réplication dans le tissu lymphoïde et comporte 3 phases successives : la primo-infection, la phase asymptomatique, dont la durée variable selon les individus est influencée par la concentration plasmatique de l'ARN viral, et la phase symptomatique caractérisée par la survenue d'infections opportunistes et de néoplasies définissant le Sida.

Les principales modalités de transmission de l'infection sont la transmission sexuelle dans 80 % des cas (homo ou hétérosexuelle), la transmission par le sang et la transmission de la mère à l'enfant essentiellement au moment de l'accouchement ou par l'intermédiaire du lait.

Le diagnostic de l'infection repose sur le dépistage des anticorps anti-HIV par des techniques Elisa et la réalisation d'un test de confirmation par western-blot ou immunoblot. Des examens complémentaires sont parfois réalisés : détection et quantification de l'antigène p24, détection et quantification de l'ARN viral plasmatique, détection de l'ADN proviral cellulaire, isolement du virus par culture.

Le suivi de l'évolution de l'infection et du traitement antirétroviral repose en première intention sur la quantification de l'ARN viral plasmatique et la détermination du taux de lymphocytes T CD4 + dans le sang périphérique. Dans les situations d'échec thérapeutique, l'évaluation de la résistance virale aux antirétroviraux par des tests génotypiques ou phénotypiques, ainsi que les dosages plasmatiques de certains médicaments, peuvent aider à optimiser les traitements de relais. Les inhibiteurs nucléosidiques et non-nucléosidiques de la transcriptase inverse, et les inhibiteurs de la protéase constituent les 3 principales classes thérapeutiques. Les inhibiteurs d'entrée (inhibiteurs de fusion, antagonistes de CCR5) ainsi que les inhibiteurs de l'intégrase constituent deux nouvelles classes venant compléter l'arsenal thérapeutique.

La décision d'instaurer un traitement prend en considération le statut clinique et immunovirologique du patient ainsi que les limites des traitements actuels : absence d'éradication virale, effets indésirables à court et moyen termes (anomalies métaboliques et syndrome lipodystrophique), difficultés d'adhérence et interactions médicamenteuses. Une fois instauré, le traitement doit avoir pour objectif une inhibition maximale de la réplication virale pour éviter le développement de résistance. La prévention demeure un élément essentiel pour combattre l'infection.

Pour en savoir plus

- Girard P.-M., Katlama C., Pialoux G. *VIH*, éd 2004, Doin.
- Pasquier C., Bertagnoli S., Messud-Petit F., Izopet J. Virologie humaine et animale, Dunod, 2005.
- Collectif (sous la direction du Pr. Yeni P.). *Prise en charge thérapeutique des personnes infectées par le VIH*. Rapport 2006. Médecine-Sciences Flammarion.
- ONUSIDA-UNAIDS. *Rapport sur l'épidémie mondiale du Sida*. www.unaids.org
- INVS. *Surveillance du VIH-Sida en France*. www.invs.sante.fr

Les infections à cytomégalovirus

J. GOZLAN, Laboratoire de virologie, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris.

Le cytomégalovirus humain (HCMV) est un virus du groupe Herpès, d'importance majeure en pathologie humaine. Il s'agit d'un virus opportuniste, responsable d'infections inapparentes ou bénignes chez le sujet immunocompétent, mais entraînant des atteintes redoutables chez l'immunodéprimé. L'extension de l'endémie de l'infection par le VIH et la multiplication des greffes et des thérapeutiques immunosuppressives expliquent ainsi la fréquence des infections graves provoquées par ce virus. La reconstitution immune observée chez les sujets VIH+ sous multithérapie antirétrovirale a néanmoins réduit la prévalence de ces atteintes dans le cas du Sida.

I. Historique

Le nom de ce virus provient de l'augmentation de la taille des cellules infectées (20 à 35 µm), qui se caractérisent par ailleurs par la présence d'inclusions virales, nucléaires et cytoplasmiques. Les premières descriptions de ces cellules ont été faites en 1904 sur des autopsies d'enfants mort-nés tandis qu'en 1956, la réplication virale est réalisée *in vitro* sur cultures cellulaires. À cette époque, le virus est dénommé « virus des glandes salivaires », en raison de son tropisme pour l'épithélium bordant les canaux salivaires. En 1960, le terme de « cytomégalovirus » est définitivement adopté. Les techniques de biologie moléculaire ont permis ces 20 dernières années la compréhension du rôle et du fonctionnement de certains de ses gènes, ainsi que de son mode de transcription. En 1993, la séquence nucléotidique complète de son génome est déterminée.

II. Classification et structure

Le HCMV appartient à la famille des *Herpesviridae*, famille comprenant par ailleurs les herpès simplex virus 1 et 2 (HSV1 et 2), le virus de la varicelle et du zona (VZV), le virus Epstein-Barr (EBV), ainsi que les sixième, septième et huitième virus herpétiques humains plus récemment décrits (HHV6, HHV7 et HHV8).
Son étroite spécificité d'hôte et son long cycle de réplication le font classer dans la *sous-famille des Herpesviridae-β*.
Comme les autres membres de la famille des *Herpesviridae*, le HCMV est un virus à ADN linéaire double-brin enroulé autour d'une nucléocapside protéique, entouré d'un *tégument* fibrillaire et d'une *enveloppe glycoprotéique* lui conférant une grande fragilité. Son génome est le plus long (240 000 paires de bases) et le plus complexe parmi les *Herpesviridae*. Il se constitue de deux segments, court et long, encadrés de séquences répétitives terminales ou internes. Il contient plus de 200 gènes, codant pour une centaine de polypeptides dont la plupart ne sont pas encore caractérisés.

L'expression des gènes viraux se fait en cascade en trois phases :

- une phase très précoce ou « immediate early » (IE), au cours de laquelle seule une petite partie du génome est transcrite en des ARNm codant pour des protéines de régulation ;
- une phase précoce ou « early » (E) qui voit s'exprimer une plus grande partie de ce génome, et notamment des protéines enzymatiques nécessaires à la réplication virale ;
- une phase tardive ou « late » (L), qui débute en même temps que la réplication et au cours de laquelle la quasi-totalité des gènes va s'exprimer, codant essentiellement pour des protéines structurales.

Certaines régions du génome possèdent des homologies avec des séquences d'ADN cellulaire.

III. Épidémiologie

Les infections à HCMV sont fréquentes et ubiquitaires. La séroprévalence est fonction de l'âge, des conditions socio-économiques de la région étudiée et de certains facteurs de risque.

En Europe et en Amérique du Nord, environ 50 % des adultes ont rencontré le virus et possèdent des anticorps, tandis que ce chiffre avoisine les 100 % en Afrique, Asie et Amérique du Sud. De la même manière, *la quasi-totalité des homosexuels masculins et des toxicomanes pratiquant par voie intraveineuse est immunisée.*

Le réservoir du HCMV est strictement humain et le sujet infecté excrète de manière intermittente du virus dans les urines, les sécrétions cervicales, le sperme, le lait, la salive ou les larmes. Les modalités de transmission sont donc multiples :

- par *voie placentaire* : 1 % des nouveau-nés naissent en excrétant du virus dans leurs urines, et ont donc été infectés *in utero* ;
- par *voie périnatale* : 15 % des nourrissons sont excréteurs à 1 an, ayant rencontré le virus au moment de l'accouchement, lors du maternage ou de l'allaitement ;
- par *voie pharyngée ou génitale*, modalités expliquant l'augmentation de la séroprévalence observée pendant l'adolescence et à l'âge adulte ;
- par *voie sanguine*, et en particulier par les fractions cellulaires des produits transfusés ;
- par *le greffon*, s'il provient d'un donneur séropositif.

IV. Histoire naturelle d'une infection à HCMV

Comme pour les autres membres de la famille des Herpesviridae, l'infection à HCMV procède d'une *primo-infection*, persistant secondairement sous forme de *latence virale* entrecoupée d'épisodes de *réactivations ou de réinfections*.

Le siège initial de la primo-infection dépend du mode de transmission. Après celle-ci, le virus va disséminer dans tout l'organisme par voie hématogène. Le HCMV

infecte en effet *des cellules sanguines circulantes*, lymphocytes, monocytes et polynucléaires. Dans ces cellules, l'infection est le plus souvent abortive, caractérisée par une expression du génome viral réduite à certains gènes très précoces. La stimulation et/ou la différenciation des cellules mononucléées peuvent néanmoins permettre une extension du cycle viral, avec réplication virale, expression des gènes précoces et tardifs et production de virions. Un cycle complet est également autorisé dans *certaines cellules épithéliales* des canaux glandulaires, expliquant l'excrétion salivaire et urinaire prolongée du virus, et dans *les cellules endothéliales des capillaires*.

Des mécanismes d'*immunité essentiellement cellulaire* (lymphocytes T cytotoxiques et cellules NK) interviennent ensuite pour détruire les cellules infectées. En dépit de ces phénomènes, *des génomes viraux persistent toute la vie dans certaines cellules* (cellules sanguines mononucléées, cellules réticulo-endothéliales, macrophages tissulaires, cellules épithéliales des tissus glandulaires), *définissant la latence virale*.

C'est à partir de ces sièges de latence que surviennent épisodiquement les réactivations virales, spontanément ou à l'occasion de circonstances favorisantes : *stimulation allogénique* (en cas d'allogreffe), *déficit de l'immunité cellulaire*. Enfin, des réinfections ont été démontrées, notamment chez le greffé.

V. Pouvoir pathogène

Les maladies dues au HCMV sont un modèle d'infection opportuniste car leurs manifestations sont directement fonction de l'état immunitaire de l'hôte.

A. Chez le sujet sain

Sur ce terrain, *la primo-infection est le plus souvent inapparente*, ou bénigne, pseudogrippale. Biologiquement, on observe *un syndrome mononucléosique sans agglutinines hétérophiles*, une augmentation des enzymes hépatiques, plus rarement une anémie hémolytique ou une thrombopénie.

Parfois, l'atteinte est plus sévère, entraînant une fièvre et une fatigue prolongée voire des localisations viscérales, hépatiques, pulmonaires, digestives ou neurologiques. Le pronostic demeure néanmoins excellent, la guérison survenant spontanément en quelques semaines.

La latence et les réactivations sont toujours asymptomatiques chez l'immunocompétent.

B. Infection maternofœtale

S'ils ne sont pas au sens strict des immunodéprimés, le nouveau-né et *a fortiori* le fœtus sont immuno-incompétents et donc à risque d'une atteinte sévère liée au HCMV. Il faut rappeler que c'est sur ce terrain qu'ont été décrites initialement les premières maladies sévères dues à ce virus.

Appréciation du risque

L'incidence de l'infection néonatale est élevée, aux alentours de 1 %, mais sa fréquence et *son pronostic diffèrent selon le caractère primaire ou secondaire de l'infection maternelle*.

L'incidence de la primo-infection à CMV en cours de grossesse se situe entre 1 et 2 %. La virémie qui accompagne cette primo-infection maternelle transmet le virus au fœtus dans 25 à 50 % des cas, tous termes confondus. L'infection acquise *in utero* est responsable d'une fœtopathie en général décelable à l'échographie, mais n'est symptomatique que dans 10 à 15 % des cas. Plus l'infection est précoce, plus elle est sévère, parfois responsable de mort *in utero*. Si la grossesse se poursuit, le bébé peut naître prématuré et hypotrophe, mais le tableau clinique complet, réalisant la maladie des inclusions cytomégaliques, est heureusement rare : 1 à 5 cas pour 10 000 naissances. La majorité des infections symptomatiques touchent de manière dissociée et variable la rétine, l'appareil auditif ou le système nerveux, et comportent un risque de séquelles neurologiques et surtout auditives (10 à 15 % des cas), parfois même observées en l'absence de tout signe clinique à la naissance. Les réactivations maternelles, également responsables d'infections néonatales, n'entraînent en revanche qu'exceptionnellement une atteinte clinique chez le nouveau-né. Des réinfections de femmes enceintes déjà immunisées ont récemment été démontrées et peuvent s'associer à des signes cliniques chez l'enfant.

Enfin, des transfusions néonatales peuvent également transmettre le virus chez un enfant séronégatif, et il est recommandé sur ce terrain de sélectionner des produits sanguins provenant de donneurs séronégatifs (*fig. 1*).

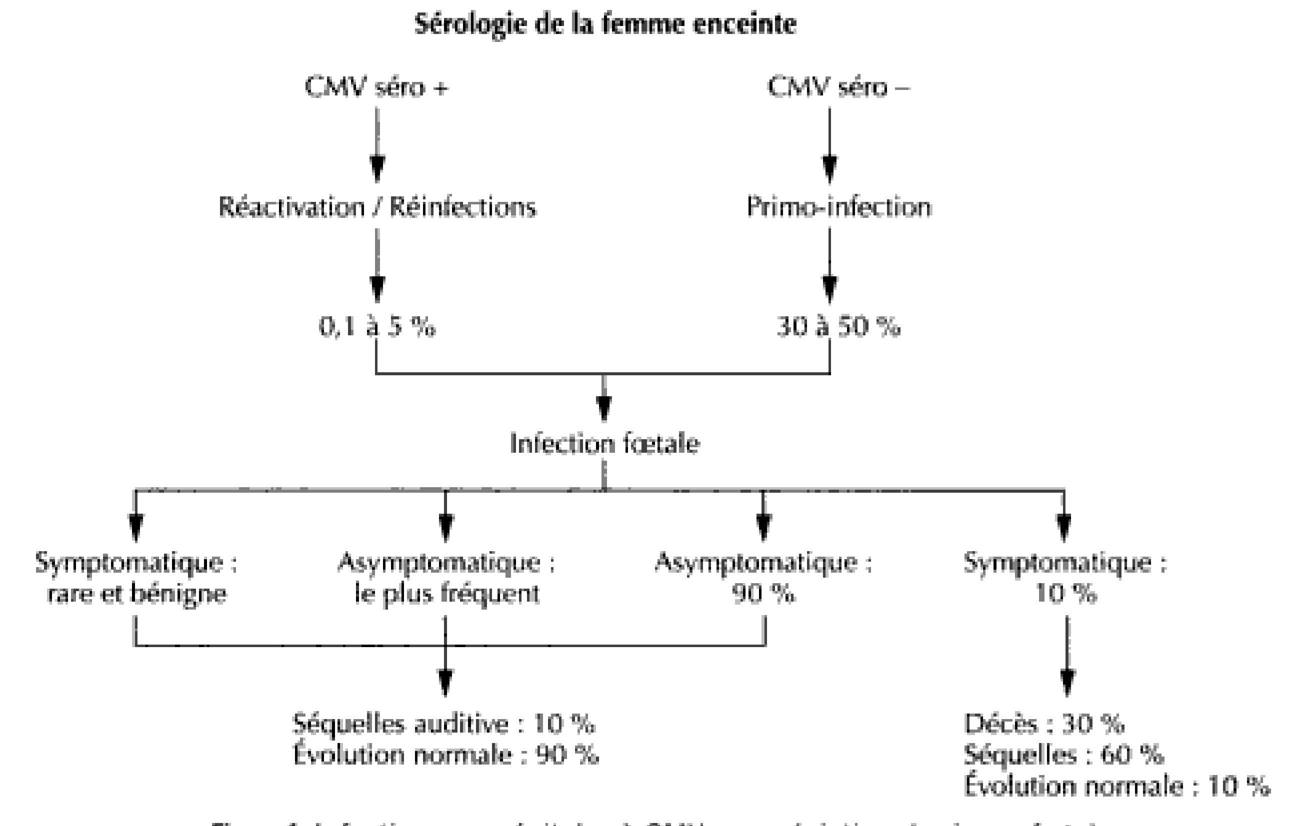


Figure 1. Infections congénitales à CMV : appréciation du risque fœtal

C. Chez l'immunodéprimé

L'importance de l'endémie de l'infection due au VIH associée à l'élargissement des indications des traitements immunosuppresseurs et des greffes font que le problème de l'infection à HCMV s'est maintenant déplacé du nouveau-né vers *les patients atteints du Sida et les transplantés*. Sur ces deux populations, le CMV représente un agent opportuniste majeur, menaçant le pronostic vital ou fonctionnel du patient infecté, ainsi que celui du greffon.
L'immunodépression cellulaire fait le lien entre ces deux populations, mais l'infection à HCMV et les maladies qui en résultent revêtent des caractéristiques bien particulières.

1. Au cours de la maladie sida

L'infection à HCMV est une complication tardive du *Sida* survenant lorsque l'immnodépression est importante, chez des sujets ayant en règle moins de 100 lymphocytes CD4 +/mm^3. L'avènement en 1996 des multithérapies antirétrovirales a considérablement diminué l'incidence de l'infection chez les sujets répondeurs, mais celle-ci reste à craindre chez les sujets en échappement thérapeutique ou chez ceux ignorant leur séropositivité VIH (CMV inaugural). Elle peut s'accompagner d'atteintes viscérales définissant la maladie à CMV.
Ces maladies sont, par ordre de fréquence :

- des *rétinites* conduisant, en l'absence de traitement, vers la cécité ;
- des atteintes du tube digestif : *colites ou œsophagites* ;
- des *surrénalites ou des hépatites* ;
- des *atteintes du système nerveux* : encéphalites, myéloradiculites ou neuropathies périphériques.

Le HCMV est fréquemment retrouvé dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire de sujets VIH+, mais n'entraîne que très rarement une réelle pneumopathie.
Enfin, *un rôle aggravant de l'infection à HCMV sur l'évolutivité de la maladie à VIH a été suggéré* par des études de suivi de cohortes, par des descriptions de co-infections cellulaires, notamment dans le système nerveux central, et par des interactions moléculaires bilatérales entre le HCMV et le VIH, démontrées *in vitro*.

2. Chez les greffés

L'infection se révèle précocement après la greffe, le plus souvent dans les trois mois qui la suivent, le risque diminuant ensuite à mesure que l'immunité du sujet transplanté se restaure. Les caractéristiques de la greffe, tant au niveau de l'organe transplanté que des statuts sérologiques du donneur et du receveur, influent considérablement sur la fréquence et la gravité de l'infection.
Chez le receveur CMV séropositif, et en l'absence de toute prophylaxie antivirale, l'incidence de l'infection est ainsi estimée à environ 60 % chez les greffés de moelle, 50 % chez les greffés de foie et de rein, 70 à 90 % chez les greffés cardiaques et cardio-pulmonaires. Le risque est en revanche très faible pour un couple R–/D– (à condition de sélectionner des apports sanguins séronégatifs), et plus élevé pour un couple R–/D+.

Le retentissement clinique de l'infection varie également selon l'organe transplanté et les sérologies prégreffe : les primo-infections (D-/R +) sont plus volontiers symptomatiques que les réactivations ou les réinfections, les allogreffés de moelle ou cardiopulmonaires font des maladies plus sévères que les autogreffés de moelle ou que les transplantés rénaux ou hépatiques.
À la différence des patients atteints de Sida, *l'atteinte pulmonaire est la principale et la plus grave des localisations viscérales de l'infection à HCMV*, surtout chez les allogreffés de moelle où elle demeure mortelle dans près de la moitié des cas malgré l'instauration d'une thérapeutique antivirale ; la réaction du greffon contre l'hôte est un facteur de risque important de la survenue de cette pneumopathie.
Chez tous les transplantés, *l'atteinte du greffon* est également caractéristique de l'infection à HCMV, responsable d'un dysfonctionnement de celui-ci, avec menace de rejet, voire échec de la greffe imposant la retransplantation. L'atteinte de la rétine est à l'opposé rarissime au décours d'une greffe.

VI. Diagnostic virologique

La gravité de l'infection à CMV chez l'immunodéprimé associée à l'existence de thérapeutiques actives mais onéreuses, et souvent toxiques, expliquent l'importance d'un diagnostic virologique efficace. *Ce diagnostic devra être rapide, sensible, et surtout prédictif d'une atteinte viscérale.*

A. Diagnostic direct

Ce diagnostic cherchera à mettre en évidence le virus ou ses structures, antigéniques ou moléculaires. Les prélèvements concernés sont variés : sang, urines, liquide de lavage broncho-alvéolaire, liquide céphalo-rachidien ou biopsies tissulaires.

1. Méthodes de culture

a) Isolement viral

Les cellules les plus souvent utilisées sont *des fibroblastes embryonnaires humains*. La réplication du CMV sur ces cellules permissives est objectivée par *l'effet cytopathique* (ECP) spécifique induite par le virus : *foyers de cellules ovalaires, volumineuses, réfringentes, à croissance lente selon le grand axe des fibroblastes.*
Cet isolement viral, qui reste la méthode de référence, est la seule méthode permettant l'obtention de la souche virale, indispensable à la réalisation d'un antivirogramme. Néanmoins, le long délai d'apparition de cet ECP (8 à 20 jours le plus souvent), lui fait actuellement préférer à but diagnostique les techniques rapides.

b) Techniques rapides

L'obtention *d'anticorps monoclonaux* de grande qualité a révolutionné le diagnostic de l'infection à CMV. En effet, la détection spécifique d'un antigène très précoce du CMV peut s'effectuer après 24 ou 48 heures de culture au moyen de réactions immunocytochimiques réalisées sur plaques 24 puits. Ces techniques sont au moins aussi sensibles que l'isolement viral pour les recherches de virus extracellulaires présents au niveau des urines ou des LBA. Pour les recherches de virémie, leurs performances vont dépendre des phénomènes de cytotoxicité parfois provoqués par les leucocytes, cytotoxicité que l'on peut contrôler en adaptant le nombre de puits inoculés au nombre de leucocytes recueillis.

2. Détection directe d'antigènes viraux

Ces anticorps peuvent également être utilisés directement sur les produits pathologiques. *L'antigénémie CMV* est démontrée par la mise en évidence de la protéine de matrice pp65 dans le noyau des polynucléaires circulants. Cette technique, qui permet *un résultat en quelques heures, est très spécifique et sa sensibilité est supérieure à celle de l'isolement*. L'antigénémie est de plus *quantitative* et une corrélation existe entre le nombre de noyaux positifs et le risque de développer des signes cliniques. L'antigénémie se négative plus tardivement que les virémies chez les patients sous chimiothérapie anti-CMV, et permettrait un meilleur suivi thérapeutique. Son rendement optimal nécessite un délai bref (inférieur à 3 heures) entre le prélèvement sanguin et la fixation des leucocytes.
La détection directe de protéines virales peut également s'effectuer sur coupes histologiques ou sur des cellules recueillies après lavage broncho-alvéolaire.

3. Détection d'acides nucléiques viraux

Les techniques d'hybridation moléculaire sont applicables à la mise en évidence de séquences virales dans un prélèvement. L'hybridation *in situ*, réalisée sur frottis cellulaires ou coupes histologiques, permet d'identifier les cellules infectées et peut se combiner à de l'immunocytochimie. Les renseignements apportés par cette technique sont donc hautement qualitatifs, mais sa sensibilité reste modérée.
Les méthodes classiques d'hybridation, réalisées après extraction des acides nucléiques par dot blot ou southern-blot, n'ont pas montré de gain notable de sensibilité par rapport à la culture et elles sont maintenant abandonnées.
L'amplification génique, par polymérisation en chaîne ou PCR, permet d'obtenir plusieurs millions de copies d'une séquence du génome viral, autorisant ainsi sa détection très sensible au sein d'un produit pathologique. Ses meilleures indications sont celles où les techniques traditionnelles sont en défaut, comme la détermination d'une virémie chez un sujet aplasique ou la recherche d'ADN viral dans le liquide céphalo-rachidien. Des techniques de quantification moléculaire de la charge virale (par PCR en temps réel notamment) commencent à apparaître, autorisant une analyse plus fine des résultats vis-à-vis du risque de développer une atteinte viscérale.
L'interprétation clinique de ces nouveaux outils doit tenir compte de tous les paramètres qui influent sur les sensibilités et spécificités des réactions vis-à-vis de l'infection et surtout de la maladie à CMV.

B. Diagnostic indirect

Ce diagnostic est simple mais son apport est limité par *le caractère aléatoire et retardé de la réponse humorale* chez l'immunodéprimé et par la *fréquence des apports passifs d'anticorps*, consécutifs à l'administration de produits sanguins ou de greffes d'organes. La sérologie garde toutefois son intérêt pour le diagnostic d'une primo-infection chez l'immunocompétent ou chez la femme enceinte. La détection d'IgG s'effectue le plus souvent par immuno-enzymologie (Elisa) ou par agglutination passive. *L'intérêt majeur de cette détermination est la connaissance du statut sérologique du couple donneur/receveur d'une greffe* qui va conditionner les approches préventives de l'infection à CMV. De la même manière, ces techniques permettent le dépistage de donneurs de produits sanguins séronégatifs devant être administrés aux sujets à haut risque de primo-infection : nouveau-nés, receveurs séronégatifs d'un donneur séronégatif. Leur fiabilité n'est pas parfaite puisque des sujets séronégatifs peuvent être porteurs d'ADN viral intraleucocytaire détecté par PCR. Chez la femme enceinte, la datation de l'infection primaire peut-être essentielle. Dans ce cas, la détection d'IgG anti-CMV peut être affinée par la détermination de l'« avidité » de l'anticorps, qui est proportionnelle à l'ancienneté de la primo-infection.
La détection des IgM utilise des techniques d'immunocapture qui permettent d'éviter certains faux-positifs dus à la présence du facteur rhumatoïde. Ces IgM ne sont pas spécifiques d'une primo-infection et peuvent persister de nombreux mois, notamment chez les greffés chez lesquels ils sont généralement d'un bon pronostic. L'avenir de la sérologie CMV réside dans la détermination d'épitopes immunogènes permettant une discrimination plus nette entre primo-infection, latence et réactivation du virus.

VII. Éléments de thérapeutique

Le traitement curatif d'une infection ou d'une maladie à HCMV repose sur des drogues agissant sur l'ADN polymérase virale : le ganciclovir (ou sa prodrogue active par voie orale, le valganciclovir), le foscarnet et le cidofovir. Ces produits inhibent la réplication virale, et ne sont pas actifs sur un virus latent ; il s'agit donc d'agents virostatiques.
Le ganciclovir est un analogue des nucléosides, nécessitant pour être actif une triple phosphorylation dans la cellule infectée. Le foscarnet est un dérivé des pyrophosphates, il agit directement sur la polymérase virale. Le cidofovir est un analogue nucléotidique devant être deux fois phosphorylé avant d'être actif.
Chacun de ces produits induit une toxicité qui lui est propre, rénale pour le foscarnet et le cidofovir, médullaire pour le ganciclovir, ce qui limite leurs indications aux formes sévères d'infection survenant notamment chez un immunodéprimé. Tous requièrent une administration par voie intraveineuse, excepté le valganciclovir qui est actif par voie orale et qui est indiqué dans le traitement curatif des rétinites à CMV au cours du Sida ou en prophylaxie au cours des transplantations d'organes solides.

Des souches résistantes ont été décrites et doivent être évoquées chez un sujet continuant d'excréter du virus après plus d'une semaine de traitement. Le traitement curatif d'une rétinite chez un sujet VIH+ peut se prolonger par une prophylaxie secondaire, instaurée le temps d'obtenir une reconstitution immunologique sous traitement antirétroviral.
Chez les greffés, des stratégies préventives de l'infection à HCMV se sont élaborées, reposant sur l'administration prophylactique de drogues inhibant la réplication virale dans les deux ou trois premiers mois d'une greffe à risque de primo-infection (D+/R–) ou de réactivation virale (R+). En cas de situation D–/R–, la sélection des produits sanguins administrés provenant de donneurs séronégatifs élimine presque complètement le risque d'infection.
Une autre modalité de prévention chez le greffé est le traitement « anticipé » (« preemptive therapy ») des infections asymptomatiques, avant que ne se développent des signes d'atteintes viscérales. Cette modalité, qui impose un suivi virologique systématique des patients, a permis de réduire considérablement le risque de survenue sur ce terrain d'atteintes potentiellement mortelles, telles les pneumopathies à CMV. Les modalités du traitement sont alors similaires à celles utilisées lors des traitements curatifs.

L'essentiel de la question

Le cytomégalovirus humain (HCMV) est un virus à ADN enveloppé, membre de *la famille des Herpesviridae, sous-famille β*. Le génome viral est un ADN double-brin linéaire de 240 000 paires de bases, avec une capacité codante importante, pour au moins une centaine de protéines. *Les infections à HCMV sont fréquentes* avec une séroprévalence d'environ 50 % chez les adultes vivant dans les pays développés mais pouvant être bien plus élevée dans les pays en voie de développement ou chez certaines populations (toxicomanes, homosexuels). Sa transmission implique un *contact étroit* (maternage, voie pharyngée ou génitale) et peut également s'effectuer par *voie placentaire ou à l'occasion d'une transfusion ou d'une greffe*.
Comme pour les autres virus du groupe Herpès, l'histoire naturelle de l'infection procède d'une primo-infection, suivie d'une latence indéfinie dans l'organisme entrecoupée de réactivations. De nombreux organes et cellules sont cibles de l'infection *in vivo*, infection parfois productive, mais le plus souvent latente, avec une restriction plus ou moins totale de l'expression des gènes viraux. Le passage de la latence à l'infection productive dépend du moment et du site cellulaire de l'infection, mais également de facteurs extérieurs à la cellule : *stimulation allogénique, niveau d'immunocompétence*. Le HCMV est en effet un *virus opportuniste*, responsable d'infections le plus souvent inapparentes chez l'immunocompétent mais redoutables chez l'immunodéprimé, en particulier le sujet atteint du Sida et le greffé. Au cours du Sida, les atteintes rétiniennes sont au premier plan, suivies des atteintes digestives et neurologiques. *Les multithérapies antirétrovirales efficaces ont heureusement réduit depuis 1996 la fréquence de ces redoutables maladies*. Chez les greffés, c'est la pneumopathie et l'atteinte du greffon qui sont le plus à craindre. Une primo-infection à HCMV durant la grossesse comporte également un *risque d'infection fœtale*, avec dans ce cas un retentissement clinique (essentiellement neurosensoriel) évalué à environ 10 % des infections transmises.

Le diagnostic virologique doit privilégier les techniques directes, mettant en évidence *les antigènes ou le génome du virus* dans les prélèvements pathologiques (leucocytes, liquide de lavage broncho-alvéolaire, biopsie). Les méthodes indirectes (sériologie) gardent leur intérêt dans le diagnostic de la primo-infection chez l'immunocompétent et la femme enceinte, ou pour connaître le statut sérologique d'un couple donneur/receveur, avant une greffe.
Des thérapeutiques antivirales spécifiques existent, *toutes ciblées sur l'ADN polymérase virale*. Leur toxicité limite leur utilisation aux immunodéprimés chez qui des approches de *prévention ou de traitement anticipé* sont maintenant instaurées, en particulier chez certains greffés.

Pour en savoir plus

- Mazeron M.-C. (coordinateur). *Cytomégalovirus*. Guide Medi-Bio ; Paris Elsevier, 2002.
- Soderberg-Naucler C., Nelson J.-A. Human cytomegalovirus latency and reactivation, a delicate balance between the virus ant its host's immune system. *Intervirology* 1999 ; 42 : 314-21.
- Hodson E.-L. *et al.* : Antiviral medications to prevent cytomagalovirus disease and early death in recipients of solid organ transplants : a systematic reviaw of randomized clinical tril. *Lancet* 2005 ; 365 : 2105-15.
- Emery V.-C. Investigation of CMV disease in immunocompromised patients. *J Clin Pathol* 2001 ; 54 : 84-8.

Parasitologie
Mycologie

Pathologies d'origine mycosique

M.-D. LINAS, Service de parasitologie-mycologie, CHU Rangueil, Toulouse.

La pathologie infectieuse d'origine mycosique a évolué depuis quelques années. Les infections à levures ont vu leur incidence augmenter, leur localisation se diversifier.
Parmi les Candida, Candida albicans reste l'espèce la plus fréquemment rencontrée. Mais l'emploi d'antifongiques imidazolés et triazolés a favorisé l'émergence de Candida krusei et de Candida glabrata. Ces espèces seront donc responsables de candidoses systémiques au même titre que Candida albicans ou Candida tropicalis. On parlera donc des candidoses non seulement à cause de différentes espèces responsables mais également en raison de la variété de leur localisation et de leur gravité.
En revanche, une seule espèce, Cryptococcus neoformans, est responsable de la cryptococcose, deuxième infection à levure que nous traiterons dans cet exposé. Cette mycose dont l'évolution est toujours spontanément mortelle constitue une des complications infectieuses du sujet HIV+.
Les infections à Aspergillus sont toujours à redouter. Elles constituent l'exemple type de mycoses opportunistes. Dans les pays tempérés, Aspergillus fumigatus est l'espèce la plus fréquemment isolée au niveau de la sphère bronchopulmonaire, Aspergillus niger étant surtout impliquée dans les cas d'otomycoses.
Parmi les infections à dermatophytes, ce sont les atteintes de la peau glabre et des ongles qui sont les plus fréquentes (importance de Trichophyton rubrum). L'atteinte des cheveux est dominée surtout dans les grandes villes par les teignes anthropophiles d'Afrique Noire.

I. Infections à levures

Les levures sont actuellement et très simplement définies comme le stade unicellulaire de champignons Ascomycètes ou Basidiomycètes. Elles sont donc des champignons à thalle unicellulaire se multipliant par bourgeonnement d'une cellule mère (blastospore). L'aspect de leur colonie est crémeux, plus ou moins visqueux, de couleur le plus souvent blanche (*Candida sp*, *Cryptococcus neoformans*). Ne rentrent pas dans ce groupe les champignons dimorphiques dont la forme levure est la forme parasitaire et dont la forme filamenteuse, saprophyte (forme de contamination), se cultive à 25 °C sur milieu de Sabouraud et se retrouve dans la nature.

A. Candidoses

Les candidoses sont des affections cosmopolites dues à des levures appartenant au genre Candida. Il existe de nombreuses espèces dans la nature mais quelques-unes seulement intéressent la mycologie médicale. *Candida albicans* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée chez l'homme. C'est un commensal des muqueuses, en particulier de la muqueuse digestive.

1. Agent pathogène

Du fait de son hétérogénéité, le genre Candida reste difficile à définir. Il regroupe des levures non pigmentées, productrices de pseudomycélium dans la majorité des

cas, exception faite de *Candida glabrata* (*Torulopsis glabrata*). La définition du genre est donc basée sur l'aspect morphologique que peuvent prendre les différentes espèces de Candida et ceci sur certains milieux comme le Rice Agar Tween (RAT), le Rice Agar (RA) ou le milieu pomme de terre, carotte, bile (PCB).
De nombreuses espèces appartenant au genre Candida sont impliquées dans les candidoses. L'espèce *Candida albicans* est la plus fréquente, elle représente plus de 60 % de toutes les levures isolées chez l'homme. C'est un commensal des cavités naturelles en particulier du tube digestif. Du point de vue morphologique, cette espèce est caractérisée par son polymorphisme qui peut se retrouver *in vivo* et *in vitro*. En effet, suivant le pH, le milieu de culture, la température, *Candida albicans* peut prendre, selon ODDS, trois aspects morphologiques (*fig. 1*).

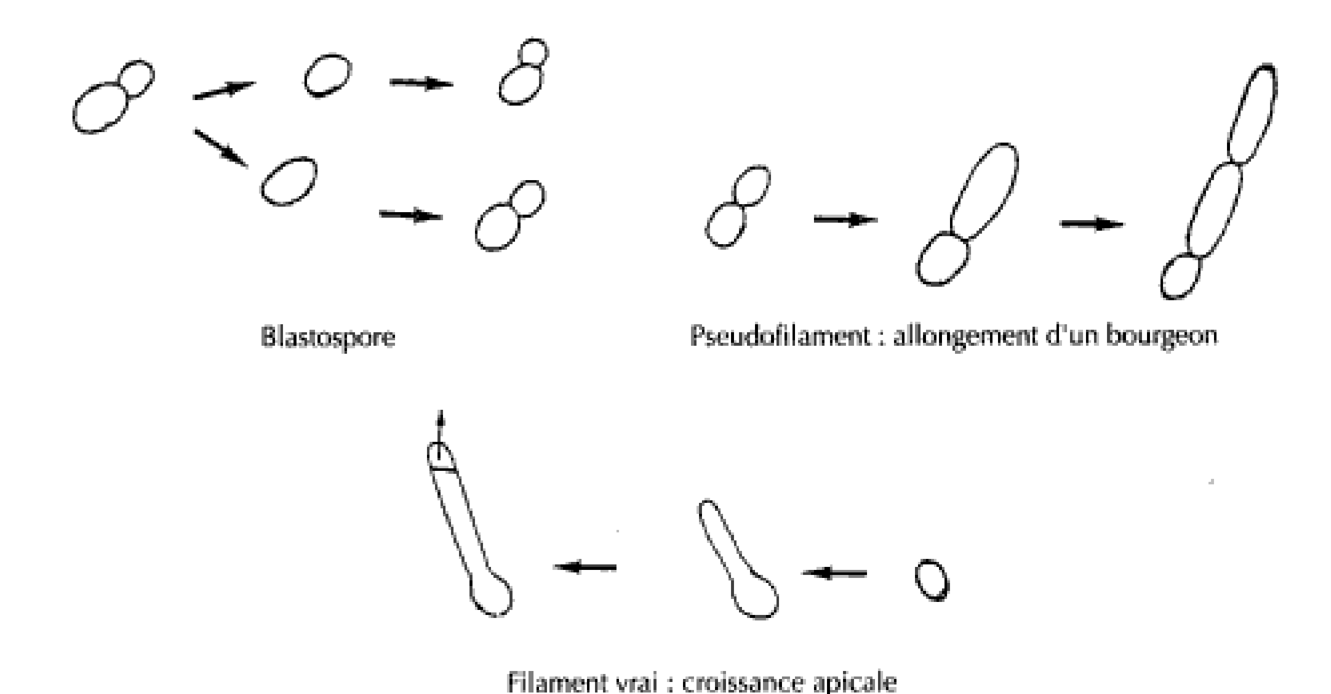


Figure 1. Forme blastospore, forme pseudomycélium (qui définit le genre Candida), forme mycélium vrai

D'autres espèces sont aussi rencontrées en pathologie humaine. Par ordre de décroissance on trouve :
- *Candida* (*Torulopsis*) *glabrata*, qui vit comme *Candida albicans* en commensal dans les voies génito-urinaires et l'intestin de l'homme. Son incidence a augmenté ces dernières années sous la pression des antifongiques azolés. Elle représente actuellement 10 à 20 % des isolats ;
- *Candida tropicalis* rencontrée sur la peau et sur les muqueuses est responsable de septicémies ;
- *Candida parapsilosis* est une levure commensale de la peau. Elle est à l'origine de lésions de la peau et des ongles. Par ailleurs, elle est impliquée dans les septicémies (2e place après *Candida albicans*) provoquées par des cathéters souillés.

Il faut aussi citer certains Candida d'origine alimentaire :
- *Candida kefyr* issue de produits laitiers ;
- *Candida krusei* dont l'émergence est due à sa résistance primaire au fluconazole ;
- *Candida norvegensis*…

La culture *in vitro* demande des milieux simples. Le milieu de base est le milieu de Sabouraud dont la composition est la suivante :
- glucose 20 g ;
- peptone de Chapoteaut 10 g ;
- eau distillée qsp 1 litre ;
- ph : 5,6.

Il est additionné d'antibiotiques antibactériens. La température d'incubation peut varier de 25 °C à 37 °C. Les mannanes constitutifs de la paroi confèrent des propriétés antigéniques induisant la synthèse d'anticorps et le relargage d'antigènes solubles dans le cas de candidoses systémiques.
Le genre Candida appartient aux Ascomycètes, un pH alcalin inhibe leur multiplication.

2. Épidémiologie

- *Candida albicans* et *Candida glabrata* vivent en commensaux dans le tube digestif et les voies génitales de l'homme et de la femme. Les autres espèces issues le plus souvent du milieu extérieur peuvent se retrouver occasionnellement sur la peau ou dans l'intestin. En revanche, il est important de noter que par rapport aux autres espèces de Candida, *Candida albicans* est toujours pathogène sur la peau. Ce sont toutes des levures opportunistes, c'est-à-dire qu'elles vont profiter d'un dysfonctionnement du système immunitaire ou d'autres facteurs pour provoquer des candidoses. La contamination est essentiellement endogène.
- Il existe de nombreux facteurs prédisposant à la survenue d'une candidose *(tab. 1)*, ils sont très différents pour une candidose superficielle ou systémique. Toute candidose profonde est liée à une immunodépression mais intervient également le type d'immunodépression *(tab. 2)*.

Tableau 1. Principaux facteurs favorisant les candidoses

I – Facteurs intrinsèques	
Physiologiques	Âge Grossesse
Pathologiques	Sida Hémopathie maligne Tumeur maligne Agranulocytose Déficit de la phagocytose Diabète Endocrinopathie
II – Facteurs iatrogènes	
Médicamenteux	Antibiothérapie antibactérienne Pilule contraceptive Immunodépresseurs Corticoïdes Antimitotiques
Chirurgicaux	Cathéter Brûlure Chirurgie digestive Chirurgie cardiaque
	Radiothérapie locale
	Héroïnomanie

Tableau 2. Les différents types d'immunodépression

Déficit des lymphocytes T	Candidose oropharyngée et digestive (Sida)
Altération de l'immunité cellulaire	Candidose cutanéo-muqueuse chronique
Déficit des neutrophiles	Septicémie et candidose à localisation systémique

- Risque nosocomial lié aux Candida : selon certaines études, les Candida sont au quatrième rang des germes isolés des hémocultures. Les candidémies représentent actuellement 10 à 15 % de l'ensemble des septicémies nosocomiales. Les principaux risques de ces candidoses nosocomiales sont la neutropénie prolongée, l'antibiothérapie lourde, la présence d'un catéther, la nutrition parentérale, la corticothérapie et la chirurgie digestive.

3. Principaux signes cliniques

Les aspects cliniques des candidoses sont très variés et peuvent s'étendre de la candidose superficielle, qui peut être banale, facilement accessible au traitement, à la candidose grave mettant en jeu le pronostic vital, parfois difficile à diagnostiquer et nécessitant un traitement lourd.

a) Candidoses superficielles

■ *Candidoses digestives*

Elles peuvent être la porte d'entrée d'une candidose septicémique ou viscérale chez les sujets à haut risque.
Candidoses buccales :
- le muguet est la lésion typique. Il est caractérisé par un enduit crémeux, blanchâtre sur la langue, la face interne des joues, le voile du palais et le pharynx. Il se voit chez le nouveau-né, le vieillard, le malade HIV+ où il est signe de mauvais pronostic ;
- la perlèche, qui est une atteinte des commissures labiales, est souvent associée à une lésion buccale ;
- la langue noire villeuse se caractérise par une hypertrophie des papilles linguales et la pigmentation est due à une oxydation. Le Candida profite de cette situation pour se développer ; l'étiologie n'en est pas toujours mycosique.

Candidoses œsophagiennes : L'endoscopie montre un muguet œsophagien avec une réaction inflammatoire. C'est l'une des affections opportunistes les plus fréquentes au cours du Sida.
Candidose gastro-intestinale : Les selles sont fréquentes, liquides, avec présence d'un grand nombre de levures et filaments. Des déshydratations sont possibles chez le nourrisson.
Candidose anale : L'anite candidosique se caractérise par un prurit intense et une sensation de brûlure. Elle peut s'accompagner d'un érythème fessier plus ou moins important chez le nourrisson.

■ *Candidoses génito-urinaires*

Vulvovaginite : C'est une affection très répandue. Elle est caractérisée par un prurit vulvaire souvent intense, des leucorrhées abondantes, grumeleuses, blanchâtres.

L'examen au spéculum est douloureux et découvre une muqueuse recouverte d'enduits blanchâtres. Dans les formes récidivantes, une candidose digestive doit être recherchée. Les facteurs favorisants les plus fréquents sont :
- antibiothérapie générale et locale ;
- traitement local antitrichomonas ;
- œstroprogestatifs oraux ;
- toilette vaginale avec savon acide ;
- diabète ;
- grossesse ;
- contamination vénérienne.

Balanite : Les symptômes sont un érythème du gland avec de discrètes érosions superficielles. Les facteurs favorisants sont :
- petits traumatismes ;
- diabète ;
- transmission vénérienne.

Candidoses urinaires : Les candiduries sont relativement fréquentes et se voient chez les malades porteurs de sondes et hospitalisés dans les services de soins intensifs. Leur interprétation pathologique est souvent délicate, elles peuvent être le témoin d'une colonisation. Les candidoses urinaires sont rares et peuvent se caractériser soit par une urétrite, soit par une cystite (diabétiques ou porteurs de sonde à demeure). Plus rarement les lésions peuvent se voir au niveau du bassinet avec formation de boules fongiques (*fungus balls*) au niveau des voies excrétrices. Enfin, le rein représente un organe-cible dans les candidoses disséminées post-septicémiques.

■ *Candidoses cutanées et unguéales*

Intertrigo : Les intertrigos des grands plis sont des lésions érythémateuses, suintantes, à bordure mal délimitée. Le fond du pli est blanc, fissuré. Tous les grands plis peuvent être atteints : inguinal, interfessier, sous-mammaire, axillaire. L'érythème fessier du nourrisson est une candidose des plis. L'intertrigo interdigital est le plus fréquent. La couche cornée est épaissie, blanchâtre. Les facteurs favorisants sont :
- la macération ;
- le contact prolongé avec l'eau ;
- les produits détergents ;
- le port de gants en caoutchouc.

Périonyxis et onyxis : Ils s'observent essentiellement aux mains. L'atteinte débute par un périonyxis formant un bourrelet au niveau de la base de l'ongle. Puis l'infection s'étend à l'ongle lui-même.

La candidose cutanéo-muqueuse chronique : C'est une entité clinique qui est due à un déficit de l'immunité cellulaire. Ce sont des affections chroniques qui peuvent être graves et qui touchent les muqueuses (buccales), les ongles et la peau (granulomes).

b) Candidoses invasives

Ce sont des affections graves, avec une fièvre régulière qui résiste aux antibiotiques à large spectre et une altération de l'état général.

Elles peuvent avoir deux origines :
- endogène à partir d'un foyer digestif ;
- exogène.

Elles comprennent les septicémies à Candida (candidémies) qui correspondent à l'isolement de Candida à partir d'une hémoculture, les candidoses systémiques ou disséminées (le terme de candidoses viscérales profondes est également employé). On va trouver :
- des localisations tissulaires d'origine hématogène : cutanée, oculaire, urinaire, cardiaque (endocardite avec végétation), ostéo-articulaire, neuroméningée ;
- la candidose hépatosplénique ou candidose chronique disséminée.

c) Allergie

L'allergie aux métabolites de Candida existe avec manifestations soit cutanées, soit respiratoires.

4. Bases du diagnostic biologique

Le diagnostic biologique d'une candidose repose d'une part, sur la mise en évidence et l'identification de la levure et d'autre part, sur le diagnostic immunologique (dans le cas de candidose profonde) avec dosage des anticorps et recherche d'antigènes circulants.

a) Diagnostic mycologique

■ *Prélèvements*

Ils sont très variables et sont fonction de la localisation de la lésion :
- au niveau des muqueuses et des lésions suintantes : écouvillon stérile humidifié ;
- les lésions cutanées squameuses sont grattées au vaccinostyle ou au grattoir ;
- les ongles sont grattés en raclant sous le bourrelet du périonyxis ;
- tout liquide pathologique est recueilli dans un flacon stérile ;
- les biopsies sont mises en flacon stérile après légère humidification, jamais de fixateur.

En règle générale, les spores de Candida ne sont guère fragiles, ne demandent pas de milieu de transport particulier. L'examen direct doit être réalisé rapidement car les levures prolifèrent à température ambiante.

■ *Examen direct*

Il est important pour juger du caractère pathogène de la souche. Il doit être corrélé avec l'abondance de la culture. On peut faire :
- un examen entre lame et lamelle à l'état frais ou après coloration au bleu lactique ;
- un frottis coloré au Gram, MGG ou au bleu de méthylène ;
- un éclaircissement à la potasse pour les squames et les débris d'ongle ;
- une coloration argentique principalement pour les liquides de lavage broncho-alvéolaire ;
- un examen histologique pour les biopsies (PAS, Gomori-Grocott).

Cet examen microscopique permet de noter :
- dans le cas de préparation fraîche, la présence ou l'absence de levures de 2 à 4 microns, ovales ou rondes, bourgeonnantes, accompagnées ou non de filaments mycéliens ;

- à l'examen des coupes histologiques, les Candida se présentent soit sous forme de levures seules, soit sous forme de levures et filaments. La présence de mucopolysaccharides dans la paroi donne une réaction PAS+.

■ *Mise en culture*

Le milieu d'isolement est le milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques antibactériens (gentamicine-chloramphénicol). Pour *Candida albicans*, un milieu sélectif est le Sabouraud-actidione. Mais, il faut savoir que d'autres espèces de Candida et d'autres levures sont inhibées par l'actidione (cycloheximide). L'incubation peut se faire à 25 °C, 30 °C ou 37 °C, suivant le prélèvement.
L'ensemencement peut se faire en fonction du prélèvement directement sur milieu chromogène.

■ *Identification*

Le développement de la culture se fait en 24 ou 48 heures sous forme d'une ou plusieurs colonies crémeuses, blanchâtres, de 1 à 2 mm de diamètre. L'examen microscopique ne montre que des formes ovoïdes de 2 à 4 microns caractérisant les blastospores. L'identification se fait sur des colonies isolées, d'où la nécessité d'un isolement si la culture est abondante en nappe.
Cet isolement se réalise :
- sur le milieu de Sabouraud, sur ce milieu l'aspect macroscopique peut être différent pour certaines espèces bien que les colonies soient blanches :
  - *C. albicans* : blanc crémeux, lisse. Certaines espèces sont plus rugueuses,
  - *C. glabrata* : blanc crémeux, brillante, plane ou lisse,
  - *C. krusei* : blanc mat, plane très sèche, parfois plissée,
  - *C. tropicalis* : blanc crémeux, souvent plissée ;
- sur milieu chromogène qui permet de différencier les espèces les plus courantes avec des pigmentations différentes des colonies. Exemple sur milieu Chromagar :
  - *C. albicans* : vert,
  - *C. tropicalis* : bleu métallique,
  - *C. krusei* : rose pâle.

L'aspect macroscopique et sur milieu chromogène ne constitue qu'un élément d'orientation pour l'identification.
Identification du genre Candida : La mise en évidence du pseudomycélium, sur milieux pauvres tels RAT, RA et PCB, définit le genre Candida. Il peut être rudimentaire ou bien développé. Il est même absent pour certaines espèces.
Identification de *Candida albicans*
- Tests morphologiques :
  - étude de la filamentation en sérum ou test de blastèse : en suspension dans un milieu riche (sérum de veau ou de cheval…) à 37 °C et en 4 heures maximum, apparition d'un tube germinatif à partir des levures (*fig. 2*) ;
  - recherche de chlamydospores : sur milieu RAT, RA ou PCB à 25 °C à l'obscurité en 24 ou 48 heures, les blastospores de *Candida albicans* forment un pseudomycélium porteur de spores arrondies, à paroi épaisse de 7 à 10 microns qui sont les chlamydospores (*fig. 3*).
- Autres tests :
  - anticorps monoclonal : agglutination de particules de latex ;

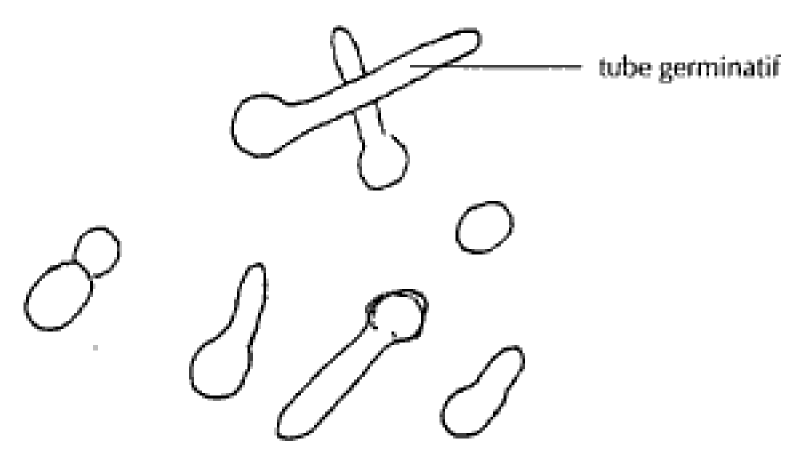


Figure 2. Test de blastèse positif

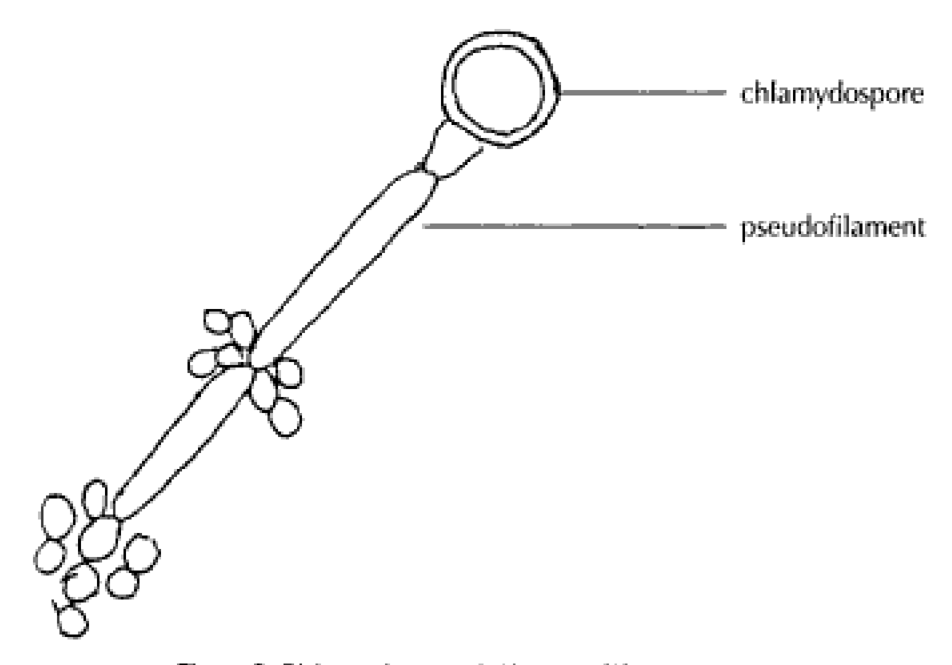


Figure 3. Chlamydosporulation positive

– milieux chromogènes permettant la détection sélective de *Candida albicans* donnant une pigmentation spécifique des colonies mais différente selon les milieux utilisés.

Identification des autres espèces de Candida :

- milieux RAT, RA ou PCB permettent de confirmer le genre de Candida pour la majorité des espèces ;
- utilisation des hydrates de carbone par voie oxydative (auxanogramme). Ce test est un test de référence. Certains sucres sont assimilés par la souche à identifier, ce qui permet à la levure de croître dans un milieu ne contenant que le composé carboné comme source de carbone. De nombreuses galeries basées sur ce principe sont commercialisées et permettent l'identification de la grande majorité des levures intéressant la mycologie médicale.

Tests complémentaires pouvant compléter cette identification :

- résistance à l'actidione ;
- réduction du tétrazolium ;
- utilisation des sucres par voies fermentatives (zymogramme).

La démarche d'identification d'une levure sera décrite au *tableau 3*.

Tableau 3. Schéma d'identification des Candida (colonie isolée sur milieu de Sabouraud)

Colonie blanche crémeuse

. Test de Blastèse
ou filamentation en sérum
— Négatif
— Positif → *C. albicans*

. Anticorps monoclonal → *C. albicans*

. RAT ou PCB
— Blastospores + Pseudofilaments + Chlamydospores → *C. albicans*
— Blastospores + Pseudofilaments : *CANDIDA*
— Blastospores : . *CANDIDA* ne donnant pas de pseudofilamentation, de petite taille

. *Autres levures*
Capsule : *CRYPTOCOCCUS*
Asque : *SACCHAROMYCES*

AUXANO-GRAMME

SUCRES

C. tropicalis, C. parapsilosis, C. kruseï
Complément : Tétrazolium, Actidione
C. glabrata

C. neoformans
S. cerevisiæ

Milieu chromogène
→ Autres (→ RAT ou PCB)
→ Coloration spécifique *C. albicans*

b) Diagnostic immunologique

Il n'a d'intérêt que dans les candidoses systémiques ou profondes, dans un but de diagnostic ou de surveillance.

■ *Détection des anticorps*

L'étude antigénique de *Candida albicans* a révélé la présence de 2 sérotypes A et B. Les différentes réactions mettent en jeu soit des antigènes figurés, soit des antigènes solubles (somatiques et métaboliques). Les principales techniques utilisées en sérodiagnostic courant sont :
- l'Elisa ;
- l'immunofluorescence indirecte ;
- l'immunoélectrophorèse.

Le taux d'anticorps anti-Candida est d'interprétation délicate. Il faut tenir compte de l'état commensal de certaines espèces : *C. albicans*, *C. glabrata*. Un titre, ou un nombre d'arcs de précipitation élevé, ou une ascension du titre des anticorps spécifiques, sont des éléments utiles au diagnostic.

■ *Détection des antigènes circulants*

Elle est intéressante chez l'immunodéprimé où la synthèse des anticorps peut être faible. La variation du taux dans le temps peut prendre une valeur significative. La recherche d'antigènes mannanes peut être réalisée par les techniques d'agglutination ou par des tests Elisa.

c) Biologie moléculaire

Elle ne constitue pas une technique de routine. Deux aspects peuvent être développés :
- épidémiologie : typage des souches ;
- diagnostique : mise en évidence de l'ADN fongique sur les prélèvements normalement stériles ou confirmation de l'indentification d'une souche par séquençage.

5. Bases du traitement

La majorité des antifongiques sont actifs sur les levures du genre Candida mais cette sensibilité peut varier en fonction de l'espèce de Candida isolée. C'est la raison pour laquelle une identification précise d'espèce est indispensable pour réaliser un antifongigramme.
- Les polyènes :
  - Amphotéricine B ou Fungizone® ;
  - Nystatine ou Mycostatine®.
- Les imidazolés et les triazolés (*tab. 4 et 5*) :
  Les imidazolés dans leur grande majorité ne sont pas absorbés par la muqueuse intestinale et seront utilisés localement. Seul le kétoconazole (Nizoral®) est absorbé (*tab.* 4). Les triazolés (*tab.* 5) constituent l'arsenal thérapeutique pour le traitement des candidoses graves.
  - La 5 fluorocytosine ou Ancotil® ;
  - La ciclopiroxolamine ou Mycoster® ;
  - Les échinocandines avec la caspofungine (Candidas®).

Tableau 4. Les différents imidazolés

Nom chimique	Spécialité	Voie d'utilisation		
		Locale	Orale	IV
Pas d'absorption digestive (quelques exemples)				
Isoconazole	Fazol®	+	–	–
Éconazole	Pévaryl®	+	–	–
Miconazole	Daktarin®	+	–	–
Tioconazole	Trosyd®	+	–	–
Bifonazole	Amycor®	+	–	–
Butoconazole	Gynomyk®	+	–	–
Sulconazole	Myk 1 %®	+	–	–
Absorption intestinale				
Kétoconazole	Kétoderm®	+	–	–
	Nizoral®	–	+	–

Tableau 5. Les différents triazolés

Nom chimique	Spécialité	Voie d'utilisation		
		Locale	Orale	IV
Fluconazole	Triflucan®	–	+	+
Voriconazole	Vfend®	–	+	+
Posaconazole	Noxafil®	–	+	–
Itraconazole	Sporanox®	–	+	–

L'étude de la sensibilité *in vitro* (antifongigramme) des différentes souches de Candida vis-à-vis des différents antifongiques se fait :

- par la méthode de diffusion en gélose en utilisant :
  - des disques imprégnés d'antifongiques et en mesurant le diamètre d'inhibition autour de ces disques,
  - des bandelettes imprégnées d'un gradient de concentration d'antifongiques donnant directement la concentration minimale inhibitrice (CMI) ;
- par la méthode en milieu liquide utilisant deux concentrations critiques d'antifongiques, en fonction de la valeur de la CMI, les souches sont classées sensibles, résistantes ou intermédiaires.

Il faut savoir :

- que les résistances *in vitro* par rapport aux polyènes sont rares ;
- qu'il peut exister des sensibilités intermédiaires vis-à-vis des imidazolés et des triazolés avec parfois apparition de résistance secondaire ;
- que 10 % des souches sont d'emblée résistantes à la 5 fluorocytosine avec risque de résistance secondaire si cet antifongique est employé en monothérapie pendant plusieurs semaines.

L'antifongigramme ne doit pas être considéré comme un examen systématique. Il est justifié du fait de la résistance confirmée de certaines espèces ou souches aux antifongiques existants. Il doit être réservé :

- aux infections profondes ou septicémiques ;
- aux évolutions cliniques défavorables malgré un traitement adapté et bien conduit ;
- aux levures isolées de malades immunodéprimés ou hospitalisés dans les services à risque.

Les principales indications thérapeutiques sont rapportées dans le *tableau 6*.

Tableau 6. Indications thérapeutiques

Candidose	NYST	AB	Imidazolés		Triazolés	5FC	Caspo-fungine	Ciclopirox
			Locaux	Kéto				
Digestive	+++	+++	Mico	+	+	–	–	–
Génitale	+++	+++	+++	+	–	–	–	–
Cutanée	++	++	++	+	–	–	–	++
Systémique	–	IV	–	++	++	++	++	–
						AB IV		

Nyst : Nystatine — Kéto : Kétoconazole — FC : 5 fluorocytosine
AB : Amphotéricine B — Mico : Miconazole — Ciclopirox : Ciclopiroxolamine

6. Conclusion

Les infections à Candida et en particulier à *Candida albicans* représentent dans la majorité des cas une pathologie courante qui reste facile à diagnostiquer, tant sur le plan clinique que biologique.

Chez les malades immunodéprimés, le risque d'une candidose profonde est toujours à craindre. Il n'est pas toujours facile, au niveau du laboratoire, de faire la part de ce qui revient à un portage intense ou un rôle pathogène vrai. C'est la raison pour laquelle le diagnostic repose sur des arguments épidémiologiques, cliniques et biologiques qu'il convient de bien connaître.

B. Cryptococcose

La cryptococcose est une infection cosmopolite due à un champignon levuriforme, *Cryptococcus neoformans*. C'est une mycose essentiellement opportuniste dont la gravité est due au tropisme de cette levure pour le système nerveux central.

1. Agent pathogène

C'est une levure encapsulée, ronde ou ovale de 4 à 8 microns. La capsule est de nature polysaccharidique. Dans les conditions habituelles, on n'observe ni mycélium, ni pseudomycélium.

Au point de vue physiologique, il faut retenir la présence d'une uréase.

On distingue deux variétés : *Cryptococcus neoformans var. neoformans* (sérotypes A et D) et *Cryptococcus neoformans var. gattii* (sérotypes B et C) auxquelles correspondent deux formes parfaites, *Filobasidiella neoformans* et *Filobasideilla bacillispora* appartenant aux Basidiomycètes.

2. Épidémiologie

a) Sources de contamination

Les fientes de pigeons et d'oiseaux constituent un substrat de conservation idéal pour *Cryptococcus neoformans*. Les levures résistent très bien dans les fientes séchées et peuvent donc être véhiculées dans l'air et ainsi inhalées. La présence dans le sol est ubiquitaire et correspond à une contamination par les déjections de pigeons et autres oiseaux.
Le cryptocoque a aussi été isolé de produits laitiers frais et jus de fruits.

b) Facteurs prédisposants

Ce sont :
- les traitements corticoïdes ;
- les maladies du système réticulo-endothélial, en particulier la maladie de Hodgkin et sarcoïdose ;
- les pathologies responsables d'un déficit en lymphocytes T : lymphome et surtout le Sida qui représente actuellement le principal facteur prédisposant ;
- plus rarement, il s'agit de greffes d'organes, de diabète, de collagénose.

c) Portes d'entrées (mode de contamination)

La porte d'entrée est principalement aérienne puisque *Cryptococcus neoformans* est véhiculé par l'air. La primo-infection est pulmonaire et secondaire à l'inhalation de poussières infestantes. L'inoculation directe cutanée est rare mais elle existe. Elle est posttraumatique.

d) Voies de dissémination

C'est la voie hématogène qui est surtout impliquée et explique les formes généralisées.

3. Principaux signes cliniques

La clinique de la cryptococcose est dominée par des manifestations méningoencéphaliques évoluant sur un mode subaigu ou chronique.

a) Formes pulmonaires

Elles passent souvent inaperçues :
- la primo-infection peut être discrète ou latente ;
- les signes d'appel de la cryptococcose pulmonaire ne sont pas spécifiques : pneumopathie banale, toux, expectorations. L'aspect radiologique est très polymorphe :

nodules, infiltrat, masses pseudo-tumorales, miliaire. Les adénopathies médiastinales sont fréquentes mais peu volumineuses ;
- l'évolution est dans la grande majorité des cas favorable chez le sujet sain. En revanche, le risque de dissémination, en particulier méningé, est grand chez le sujet immunodéprimé.

b) Méningo-encéphalite

L'atteinte du système nerveux central est la plus fréquente et la plus grave :
- syndrome méningé incomplet : céphalées (+++), nausées, fièvre peu importante et inconstante, raideur de la nuque inconstante ;
- atteinte encéphalique : troubles du caractère, de la mémoire, du sommeil, hypertension intracrânienne.

Une ponction lombaire s'impose. Elle ramène un liquide clair avec une hyperlymphocytose, une protéinorachie élevée, une glycorachie basse (inconstante) et surtout des levures encapsulées. Chez le sidéen, le LCR est souvent subnormal ou normal malgré un grand nombre de cryptocoques.

c) Manifestations cutanées

Elles peuvent être primitives mais résultent presque toujours d'une dissémination hématogène. Les lésions (papules ou ulcérations) siègent préférentiellement au visage et aux extrémités.

d) Lésions osseuses

Ce sont des abcès ossifluents, se fistulisant à la peau.

e) Formes généralisées

Elles sont fréquentes chez le sidéen. La levure est retrouvée dans les hémocultures, les urines, le lavage broncho-alvéolaire, le LCR.

4. Diagnostic biologique

a) Diagnostic mycologique

■ *Prélèvements*

Ils sont variés : LCR (+++), expectoration, lavage broncho-alvéolaire, urine, sang, pus et biopsie.

■ *Examen direct*

Il met en évidence des levures encapsulées. La capsule est visualisée par l'examen à l'encre de Chine diluée ou par la coloration au mucicarmin pour les coupes histologiques.

■ *Mise en culture*

Après incubation, à 30 °C, *Cryptococcus neoformans* pousse de 24 à 72 heures sur les milieux de Sabouraud-chloramphénicol ou Sabouraud-gentamicine.

Le milieu YNB inositol (Yeast Nitrogen Base + 2 % d'inositol) constitue un milieu d'isolement, la pousse de *Candida albicans* ne se faisant pas sur ce milieu.
Les colonies sont blanches crémeuses, très muqueuses, et deviennent beiges en 3 à 8 jours.
L'examen microscopique de la culture montre des levures rondes, de 2 à 6 microns, et une capsule plus ou moins visible.

■ *Identification*

Elle repose sur :
- l'aspect morphologique :
  - présence d'une capsule (inconstante *in vitro*),
  - absence de pseudomycélium sur milieu RAT ou PCB,
  - forme très arrondie,
  - taille ;
- l'existence d'une uréase ;
- l'assimilation en aérobie des différents hydrates de carbone (auxanogramme : lactose négatif) ;
- l'absence de fermentation des sucres ;
- l'absence de pousse en présence d'actidione.

Le pouvoir pathogène expérimental et la mise en évidence de la capsule peuvent être recherchés par inoculation à la souris.
L'isolement du *Cryptococcus neoformans*, au niveau d'un quelconque prélèvement et qui a toujours une valeur pathologique, doit toujours faire rechercher, dans le cas où elle n'est pas connue, une immunodépression.

b) Diagnostic sérologique

- La recherche d'anticorps est rarement positive et ne fait pas partie du bilan diagnostique ;
- La recherche d'antigènes circulants d'origine capsulaire constitue un moyen fiable de dépistage de la cryptococcose. Cette recherche se fait sur le LCR, le sérum, l'urine, par agglutination des particules de latex sensibilisées par des anticorps anticryptococciques, ou par technique Elisa. Ce test très sensible et très spécifique est un complément indispensable à l'examen mycologique.

5. Bases thérapeutiques

Le traitement repose sur les antifongiques systémiques :
- amphotéricine B IV associée à la 5 fluorocytosine ;
- le fluconazole en raison de sa très bonne diffusion dans le LCR, soit en première intention, soit en relais.

6. Conclusion

La cryptococcose reste une mycose grave pouvant se développer chez les immunodéprimés et en particulier chez le sujet HIV+. *Cryptococcus neoformans* en est le seul agent responsable. La présence d'une capsule lui donne son identité et a permis la recherche spécifique d'antigènes circulants, éléments indispensables pour son diagnostic biologique.

II. Infections à *Aspergillus*

Le développement de champignons filamenteux appartenant au genre *Aspergillus* provoque des mycoses souvent graves survenant sur des terrains débilités. Mycose opportuniste, l'aspergillose est la plus fréquente des étiologies parmi les pathologies respiratoires fongiques

Aspergillus fumigatus est de loin l'espèce qui semble avoir la plus grande aptitude pathogène. Mais pour des localisations particulières, d'autres espèces peuvent prédominer telle *Aspergillus niger* dans les oreilles.

A. Agent pathogène

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux formant un mycélium. Le genre *Aspergillus* est défini par la présence de filaments conidiophores, ou stipes, se renflant à son extrémité en une vésicule (tête aspergillaire) qui porte les cellules conidiogènes. Ces cellules sont des phialides sans colerette, produites directement par la vésicule ou par l'intermédiaire de métules. Les phialospores arrondies, unicellulaires, sont produites en chaînes (*fig.* 4). Les conidies peuvent être noires, blanches, jaunes, marrons ou vertes. L'ensemble des phialides, vésicule, conidies, constitue la tête conidienne.

Le genre *Aspergillus* est constitué d'un grand nombre d'espèces dont quelques-unes seulement sont isolées fréquemment.

Dans les pays tempérés, c'est *Aspergillus fumigatus* qui prédomine. Elle est responsable de 80 à 90 % des infections humaines. Les autres espèces incriminées dans les localisations profondes sont *Aspergillus flavus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Aspergillus terreus*.

Les *Aspergillus* pathogènes pour l'homme sont thermotolérants et peuvent se développer à 37 °C.

Un certain nombre d'espèces sont capables de donner une reproduction sexuée : ce sont des Ascomycètes.

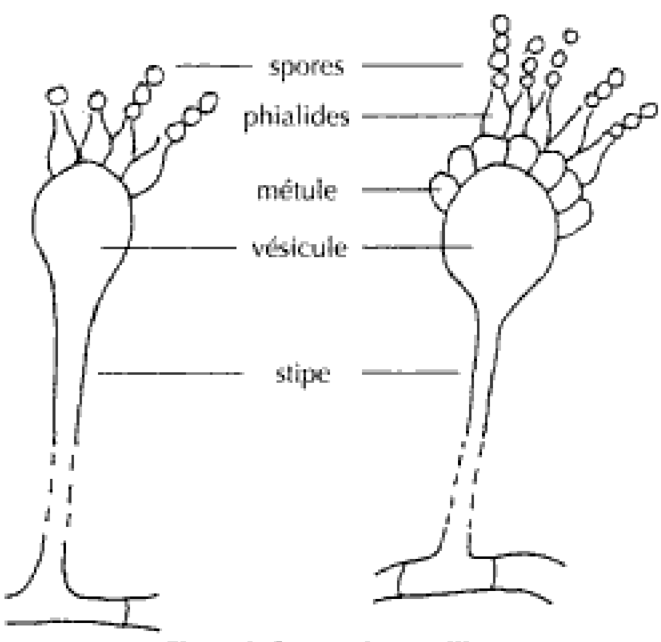


Figure 4. Genre *Aspergillus*

B. Épidémiologie

1. Mode de contamination

Les *Aspergillus* sont fréquents dans la nature. Ils vivent en saprophytes dans le sol mais aussi à sa surface et sur les végétaux. À la faveur de courants d'air, les spores d'*Aspergillus* sont véhiculées et peuvent se déposer sur des substrats divers. On peut isoler des *Aspergillus* à l'extérieur dans l'atmosphère, mais aussi à l'intérieur des habitations, sur les vêtements, dans les humidificateurs d'air, les climatiseurs. L'abondance des spores aspergillaires, leur faible diamètre (2 à 3 microns) permettent leur pénétration jusqu'au niveau broncho-alvéolaire. Cela explique les possibilités de contamination de l'homme au niveau des voies respiratoires supérieures et d'invasion lorsque les conditions locales et/ou générales sont favorables.
Plus rarement, une contamination directe peut être responsable d'infections superficielles telles que les otomycoses du conduit auditif externe ou les surinfections des lésions cutanées (brûlures).

2. Facteurs favorisant l'infestation

- Le nombre de spores infestantes inhalées ;
- La diminution des défenses immunitaires ;
- Corticoïdes ;
- Neutropénie ou altération de la fonction des neutrophiles (aplasie des greffés de moelle +++) ;
- Drogues cytotoxiques, immunosuppressives ;
- Antibiothérapie ;
- Cavité résiduelle en relation avec une bronche et faisant le lit de l'aspergillome.

C. Physiopathologie

Le pouvoir pathogène des *Aspergillus* peut s'exercer de deux façons : pouvoir infectieux et potentiel allergisant. D'une part, les spores de petit diamètre pénètrent jusqu'au niveau broncho-alvéolaire où elles germent : un mycélium se développe, favorisé par la température de 37 °C grâce à la thermophilie d'*Aspergillus fumigatus* qui peut se cultiver jusqu'à 45 °C. D'autre part, le tropisme vasculaire des *Aspergillus* facilite l'extension du mycélium qui sécrète des protéinases et des toxines nécrosantes responsables de phénomènes hémorragiques. Enfin, ces mêmes spores sont des pneumo-allergènes responsables de différents types d'hypersensibilité.

D. Principaux signes cliniques

1. Aspergilloses « infections »

a) Aspergillome

Il correspond au développement *in situ* du champignon dans une cavité pré-existante en communication avec l'arbre aérien, permettant l'arrivée des spores et l'aération de la cavité. Cette cavité est secondaire à une tuberculose, des bulles d'emphysème, une silicose, une sarcoïdose. L'absence de défenses locales notamment macrophagiques,

liée à l'aspect pathologique du revêtement interne de la cavité (granulome très vascularisé), permet le développement de la « truffe » aspergillaire qui est du mycélium pelotonné. L'examen radiologique montre une image caractéristique, c'est l'image en « grelot » : opacité arrondie dans une cavité à bords fins, siégeant souvent à l'apex et surmontée à sa partie supérieure d'un croissant radiotransparent. Le signe clinique essentiel est l'hémoptysie d'une importance variable.

b) Surinfection aspergillaire des broncho-pneumopathies obstructives chroniques (BPOC)

Elle se voit chez les malades atteints de broncho-pneumopathies chroniques :
- dilatation des bronches ;
- bronchite chronique ;
- asthme ;
- mucoviscidose, avec une perturbation grave du pouvoir d'épuration broncho-pulmonaire.

Sur terrains particuliers, la surinfection broncho-pulmonaire chronique peut évoluer progressivement vers une nécrose parenchymateuse locale, d'où le terme d'aspergillose chronique nécrosante, ou aspergillose semi-invasive. Les conditions favorisantes sont une immunosuppression partielle ou chronique, soit du fait de la maladie sous-jacente, soit liée à un traitement immunosuppresseur au long cours.

c) Bronchite aspergillaire

Rare, elle est caractérisée par le développement du champignon sur la paroi des grosses bronches. Son évolution est en général favorable.

d) Aspergillose broncho-pulmonaire invasive

On la rencontre chez des malades immunodéprimés neutropéniques, en particulier chez les greffés de moelle en phase d'agranulocytose. Elle correspond au développement de l'*Aspergillus* en plein parenchyme pulmonaire, la dissémination à partir de foyers étant favorisée par le tropisme vasculaire. Elle réalise un tableau infectieux grave, d'évolution foudroyante.

e) Aspergillose de la sphère ORL

L'otomycose du conduit auditif externe est une otite externe suintante et elle est due essentiellement à *Aspergillus niger*. L'aspergillose du sinus maxillaire réalise une sinusite chronique.

f) Aspergillose cutanée

On la rencontre chez les grands brûlés au niveau des zones nécrosées. Les lésions sont non-spécifiques : ulcérations, nodules, tâches ou maculopapules.
Des onyxis ont été décrits. *Aspergillus versicolor* est souvent en cause.

2. Aspergilloses allergiques

a) Alvéolite allergique extrinsèque

Elle se voit chez les sujets non-atopiques, exposés à l'inhalation massive de spores (foin moisi). Il s'agit d'une affection de type « poumon de fermier » avec anticorps précipitants et réponse semi-retardée.

b) Asthme aspergillaire

Il se rencontre chez des sujets atopiques. La réaction est de type I avec des anticorps réaginiques (IgE). La survenue de cette allergie est directement liée à la présence d'*Aspergillus* dans l'environnement domestique ou professionnel du malade.

c) Aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA)

Elle associe deux types d'hypersensibilité : immédiate avec anticorps réaginiques et semi-retardée avec anticorps précipitants. En même temps, les sécrétions bronchiques sont contaminées par l'*Aspergillus*.

E. Diagnostic biologique

1. Diagnostic mycologique

a) Prélèvements

Au niveau de la sphère broncho-pulmonaire :
- expectoration ;
- sécrétions bronchiques recueillies par fibro-aspiration (+++) ;
- liquide de lavage broncho-alvéolaire (+++) ;
- liquide pleural ;
- cérumen et pus dans le cas d'otomycoses ;
- prélèvements cutanés à l'écouvillon ;
- biopsies, pièces opératoires légèrement humidifiées sans fixateur.

b) Examen direct

Il est important pour l'interprétation de la culture. Il se fait entre lames et lamelles à l'état frais ou après coloration au bleu lactique, après étalement ou apposition et après coloration par imprégnation argentique (Gomori-Grocott). Il met en évidence soit :
- des filaments septés courts, de 3 à 5 microns de large à paroi bien délimitée, ramifiée à angle aigu (45°), et qui représentent la forme parasitaire du champignon. Leur présence permet de conclure au rôle pathogène de la souche d'*Aspergillus* isolée ;
- des spores qui en général ne sont pas caractéristiques ;
- des têtes aspergillaires et des filaments dans le cas d'otomycoses.

c) Mise en culture

Elle se fait d'abord sur milieu de Sabouraud plus antibiotiques antibactériens. En revanche, les *Aspergillus* sont inhibés par l'actidione, donc le milieu Sabouraud-actidione seul est à proscrire pour tout prélèvement où la mise en évidence d'un *Aspergillus* est possible. Le milieu Czapek est un milieu spécifique pour étudier la morphologie des différentes espèces. Sa formule est la suivante :

Nitrate de sodium Na NO3	3 g
Phosphate dipotassique	1 g
Chlorure de potassium	0,5 g
Sulfate de magnésium	0,5 g
Sulfate de fer (11grains moyens)	0,01 g
Saccharose	30 g
Gélose	20 g
Eau distillée	1 000 mL

L'incubation des cultures se fait à 25 °C et à 37 °C. Le temps de croissance est de 2 à 8 jours.

d) Identification

Contrairement aux champignons levuriformes, l'identification est uniquement basée sur les caractères macroscopiques et microscopiques des cultures.

- *Aspect macroscopique* : au début, la colonie est duveteuse, puis devient poudreuse à cause de l'abondance des spores. La couleur de la colonie est due aux spores. Elle est utilisée en systématique.
  - Colonie poudreuse verte : *Aspergillus fumigatus* ;
  - Colonie poudreuse noire : *Aspergillus niger*.
- *Aspect microscopique* : l'appareil végétatif est ramifié, régulièrement septé. Les filaments végétatifs sont toujours hyalins et la couleur est due aux spores.

Les fructifications conidiennes servent à la classification et à l'identification des différentes espèces en complément de l'examen macroscopique. Nous décrirons plus précisément *Aspergillus fumigatus (fig. 5)*.

Colonie verte puis vert foncé à gris noirâtre :

- stipe 300 μ, lisse incolore ;
- vésicule en forme de massue ;
- phialides directement portées sur la vésicule et insérées sur la partie supérieure (aux 2/3) ;

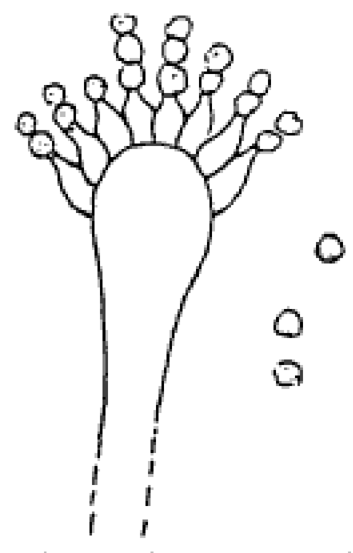


Figure 5. Aspect microscopique de *Aspergillus fumigatus*

- tête conidienne en colonne (spores en colonne) ;
- conidies rondes, vertes, échinulées de 2,5 à 3 μ.

D'autres espèces d'*Aspergillus* peuvent être isolées de produits pathologiques (*tab. 7*).

Tableau 7. Groupes d'*Aspergillus* les plus fréquemment isolés

I Phialides directement portées par la vésicule	
1. Tête claviforme	
2. Tête non claviforme :	
– vésicule plus ou moins sphérique, tête en colonne	*A. fumigatus*
– vésicule sphérique, tête radiée	*A. glaucus*
II Phialides seules et/ou métules + phialides	
1. Colonie noire	*A. niger*
2. Colonie vert jaune	*A. flavus*
3. Colonie ocre	*A. ockraceus*
4. Colonie blanche	*A. candidus*
III Phialides + métule	
1. Colonie verte ou nuance de vert :	
– tête radiée	*A. versicolor*
– tête en colonne	*A. nidulans*
2. Couleur différente	*A. terreus*

2. Interprétation des résultats de la culture

Les *Aspergillus* étant des exosaprophytes, leur isolement sur les milieux de culture demande une discussion, en particulier lors de l'isolement d'*A. fumigatus*.

a) 1er cas : rôle pathogène

L'examen direct a mis en évidence des filaments septés type *Aspergillus*. L'isolement de l'*Aspergillus* qui est souvent abondant a une valeur pathologique. Le résultat de la mycologie est corrélé à la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum (sauf, peut-être, chez les immunodéprimés). On est en présence d'une véritable germination du champignon.

b) 2e cas : rôle pathogène possible ou probable

L'examen direct est soit négatif, soit n'a mis en évidence que des spores ; la culture est abondante :

- le système d'épuration se faisant mal, de nombreuses spores ont été piégées, ce qui explique la culture abondante sans qu'il y ait une greffe véritable du champignon. Cependant, le risque infectieux existe si le terrain de l'hôte est favorable ;
- bien qu'il n'y ait pas eu de filament à l'examen direct, une culture abondante peut quand même être le témoin d'une véritable aspergillose. En effet, l'examen direct ne tient pas toujours compte de la gravité du parasitisme. Le dosage des anticorps pourrait éventuellement confirmer l'infestation.

c) 3[e] cas : rôle non pathogène, contaminant – rôle pathogène possible

L'examen direct est négatif :
- la culture est peu abondante, l'*Aspergillus* est uniquement un contaminant ;
- la culture est peu abondante mais le malade est immunodéprimé. L'examen mycologique du prélèvement ne rend pas toujours compte de la gravité de l'infestation. L'interprétation est délicate car on ne peut pas exclure totalement, surtout chez un malade neutropénique, le rôle pathogène du champignon d'autant que le sérodiagnostic habituel peut être non significatif chez l'agranulocytaire.

3. Diagnostic immunologique

a) Dosage des anticorps

L'immunoélectrophorèse est la technique de référence. Elle met en évidence des arcs de précipitations. Elle doit être complétée par la révélation d'arcs, surtout d'activité enzymatique : activité catalasique (fraction J) et activité chymotrypsique (fraction C) qui sont spécifiques de l'infection aspergillaire.
L'électrosynérèse, plus rapide, permet la révélation de l'arc à activité chymotrypsique. Chez l'immunodéprimé, la recherche de précipitines est souvent négative ou se positive trop tardivement. À côté des infections aspergillaires, ces techniques ont toujours leur valeur pour le dosage des anticorps précipitants dans le cas d'aspergillose allergique.
Autres techniques :
- hémagglutination ;
- techniques immunoenzymatiques (Elisa) ;
- immunofluorescence indirecte : se pose un problème de standardisation ;
- dosage des IgE spécifiques dans les aspergilloses allergiques.

Le *tableau 8* résume les différentes corrélations entre diagnostic mycologique et sérologie dans les différentes formes d'aspergilloses.

Tableau 8. Aspergilloses : corrélations mycologie – sérologie (anticorps)

Syndromes	*Aspergillus* dans les prélèvements broncho-pulmonaires	Anticorps précipitants
Aspergillome	+++	+++
Aspergillose invasive	+ à +++	+ (Peut être négative si immunodépression)
Bronchite aspergillaire	+++	+++
Surinfection des BPOC et mucoviscidose	Culture : +++	+ à +++
Alvéolite allergique extrinsèque	–	+++
Asthme aspergillaire	– Enquête aéromycologique +++	–
ABPA	+++	+++

b) Antigènes circulants

Leur recherche peut être intéressante chez l'immunodéprimé car les sérologies peuvent se révéler négatives. Leur mise en évidence utilise des tests d'agglutination et la technique Elisa. Ces tests peuvent rendre de grands services pour confirmer plus précocement le diagnostic d'aspergillose pulmonaire invasive.

4. Biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire constituent un apport intéressant pour contrôler l'épidémiologie des aspergilloses invasives nosocomiales.

F. Bases du traitement

1. Molécules

- Amphotéricine B (AmB) IV et formulations lipidiques d'amphotéricine B ;
- Les dérivés azolés : itaconazole (Sporanox®), voriconazole (Vfend®), posaconazole (Noxafil®) ;
- Les échinocandines avec l'acétate de caspofungine (Candidas®).

2. Traitement chirurgical

Son intérêt est dans le traitement de l'aspergillome et des sinusites aspergillaires par ablation ou curetage des masses fongiques, et dans la prévention des complications, notamment hémorragiques.

3. Indications

- Aspergillome : le traitement chirurgical est préconisé dans le traitement de l'aspergillome pulmonaire, surtout en cas d'hémoptysie.
- Dans les surinfections aspergillaires, un traitement par voie orale, itraconazole ou voriconazole, est souvent prescrit.
- Dans les aspergilloses invasives, la mise sous traitement est une urgence. Le traitement fait appel à l'amphotéricine B IV et ses formulations lipidiques, au voriconazole IV, à la caspufungine. Le posaconazole et le voriconazole par voie orale peuvent être prescrits en relais.

Pour les formes superficielles :

- les otomycoses à *Aspergillus niger* : traitement local par imidazoles ou amphotéricine B en solution (poudre pour forme IV) ;
- les formes cutanées : application locale d'une suspension faite avec la poudre d'amphotéricine B IV.

4. Conclusion

Champignons de l'environnement, les *Aspergillus* et en particulier *Aspergillus fumigatus* déterminent chez l'hôte surtout immunodéprimé des mycoses redoutables. Ces infections peuvent poser un problème de diagnostic et de thérapeutique. C'est la raison pour laquelle les mesures prophylactiques sont indispensables.

III. Infections à dermatophytes

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux ayant une affinité particulière pour la kératine de la couche cornée de la peau, des cheveux, des poils et des ongles. Ils déterminent les mycoses superficielles : les dermatophyties ou dermatophytoses. Les infections dues aux espèces suivantes que nous traiterons : *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, et *Trichophyton mentagrophytes* sont cosmopolites. En revanche, quelques espèces sont spécifiques de certaines régions du globe et très liées à un type de population (exemple : *Trichophyton soudanense* en Afrique Noire). Bien que ne faisant pas l'objet de notre exposé, nous citerons d'autres espèces intervenant dans l'épidémiologie ou au niveau des différentes lésions cliniques.

A. Agent pathogène

Plusieurs critères définissent les dermatophytes :
- ils sont kératinophiles ;
- leur multiplication asexuée est caractérisée par la production de spores diverses :
  - microconidies et macroconidies qui se voient sur les milieux de culture et qui sont formées par différenciation d'un article terminal ou portées latéralement,
  - chlamydospores peu caractéristiques qui sont des spores de résistance,
  - arthrospores qui caractérisent le champignon *in vivo* (au niveau des lésions) et qui se forment par segmentation du filament mycélien.

La morphologie des macro et microconidies, leur présence ou leur absence définissent trois genres :
- le genre *Epidermophyton* :
  - macroconidies en massue, à paroi et à cloison minces,
  - absence de microconidies,
  - une seule espèce, *Epidermophyton floccosum*, intéresse la mycologie médicale.

  Le champignon n'attaque jamais les cheveux ;
- le genre *Microsporum* :
  - macroconidies en fuseau de grande taille avec une membrane épaisse à surface échinulée. Elles jouent un rôle important dans la différenciation des espèces,
  - microconidies piriformes,
  - attaque la peau, les poils, les cheveux. Exemple : *Microsporum canis* ;
- le genre *Trichophyton* :
  - macroconidies fusiformes à paroi mince. Elles peuvent être rares, voire absentes, sur les milieux de culture usuels,
  - microconidies rondes ou piriformes. Elles permettent dans certains cas la différenciation des espèces,
  - attaque la peau, les ongles, les cheveux et les poils. Exemples : *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*.

Ce sont des Ascomycètes. Les formes sexuées ou parfaites correspondent au genre *Arthroderma* (1988).

B. Épidémiologie

Les dermatophytes sont répartis en trois groupes :

1. Espèces anthropophiles

- Parasites humains exclusifs ;
- Se transmettent directement par contact interhumain ou par linge, vêtements, sols des piscines ou plages ;
- On trouve dans ce groupe de nombreuses espèces :
  - *T. rubrum* et *T. interdigitale*,
  - *E. floccosum*,
  - des agents des teignes : *T. violaceum, T. soudanense, T. schoenleinii, M. audouinii, M. langeronii*...

  Ces agents de teigne à contamination interhumaine sont importants à connaître car ces teignes survenant chez des enfants scolarisés posent un problème d'éviction scolaire.

2. Espèces zoophiles

Elles se transmettent à l'homme par contact d'un animal contaminé ou par l'intermédiaire de poils parasités :
- chat, éventuellement chien : *M. canis* ;
- chevaux, petits rongeurs (animaux de laboratoire), lapins : *T. mentagrophytes* ;
- bovidés : *T. verrucosum* (*ochraceum*).

3. Espèces telluriques

Elles se retrouvent dans le sol. Elles sont beaucoup moins fréquentes en pathologie humaine. Exemples : *T. mentagrophytes, M. gypseum*.

C. Physiopathologie

Tout dermatophyte isolé à partir d'une lésion doit être considéré comme pathogène. Le parasitisme d'un dermatophyte débute par la germination d'une spore ou le développement d'un fragment de mycélium posé sur la peau.
- S'il existe une excoriation cutanée, le filament va pénétrer dans la couche cornée. Le filament formé se propage de façon centripète en se dichotomisant et dessinant ainsi un cercle. Il résulte une lésion en général arrondie avec une couronne de vésicules ou de squames à la périphérie.
- Les poils et les cheveux ne sont attaqués que secondairement à partir de l'ostium folliculaire avec une progression descendante vers le bulbe. À partir de ce stade, le mode de multiplication dans le cheveu peut être différent selon le dermatophyte déterminant le parasitisme pilaire.

On distingue deux types :
- endothrix uniquement à l'intérieur du cheveu ;
- ecto-endothrix à l'intérieur et à l'extérieur du cheveu.

Certains cheveux ainsi parasités deviennent fluorescents sous lumière ultra-violette (lampe de Wood).

Au niveau de l'ongle, l'attaque du dermatophyte se fait à partir du bord libre en direction de la matrice.

D. Principaux signes cliniques

Pour ne pas être limitatif, nous décrirons les différents signes cliniques dus à tous les dermatophytes bien que dans certains cas, les quatre espèces que nous avons à décrire ne soient pas toujours impliquées.

1. Teignes

Atteinte du cuir chevelu et des poils :
- teignes tondantes ;
- teignes suppurées ;
- teignes favus.

a) Teignes tondantes

Les cheveux sont fragilisés, entraînant la formation d'une plaque d'alopécie sans atteinte du bulbe.

■ *Microsporiques*

Anthropozoophiles et zoophiles.
- Plaques :
  - grandes tailles,
  - peu nombreuses,
  - recouvertes de squames,
  - cheveux cassés courts,
  - parfois aspect inflammatoire ;
- Wood positif ;
- Ecto-endothrix – microsporique ;
- Si peau glabre : épidermophytie (herpès) circinée.

M. langeroni, M. audouinii, M. canis.

■ *Trichophytiques*

Anthropophiles et contagieuses.
- Plaques :
  - plus nombreuses,
  - plus petites (5 mm),
  - cheveux peu visibles, englués dans les squames ;
- Wood négatif ;
- Endothrix.

T. soudanense, T. violaceum, T. tonsurans.

b) Teignes suppuratives

Zoophiles.
- Cuir chevelu : kérion. Il débute par la présence d'une plaque érythémato-squameuse qui se tuméfie, suppure. Les cheveux tombent formant un macaron inflammatoire surélevé (kérion de Celse). La chute des cheveux est momentanée ;

- Lésions suppurées de la barbe : sycosis ;
- Wood négatif ;
- Ecto-endothrix – microïde, mégaspore.

T. mentagrophytes, T. verrucosum.

c) Teignes faviques ou favus

Anthropophiles.

- Exceptionnelles en France ;
- Godet favique +++ de couleur jaune soufre, d'odeur fétide, formé de filaments mycéliens ;
- Au début, présence d'une tâche érythémato-squameuse du cuir chevelu, puis un mois après, apparition de plaques croûteuses étendues d'où sortent des cheveux ternes et grisâtres ;
- Les cheveux sont éliminés avec alopécie cicatricielle définitive et il ne reste que des touffes disséminées ;
- Fluorescence verdâtre des cheveux et godets ;
- Ne guérissent jamais spontanément ;
- Contagieuses ;
- Parasitisme favique : quelques filaments à l'intérieur du cheveu.

T. schoenleinii.

2. Épidermophyties

- Atteinte de la peau glabre par un dermatophyte : lésion érythémato-squameuse ;
- Fréquentes.

Microsporum, Trichophyton, Epidermophyton.

a) En dehors des plis

- Lésion la plus fréquente et la plus caractéristique : l'herpès circiné ou épidermophytie circinée est une plaque arrondie avec un bourrelet périphérique plus rouge et vésiculeux tandis que le centre guérit :
  - unique ou multiple,
  - forme plus inflammatoire ou plus croûteuse.

  M. canis, T. mentagrophytes, T. rubrum…
- Lésion cutanée due à *T. rubrum* : dermatophyte anthropophile le plus fréquemment rencontré en pathologie. Responsable des lésions suivantes :
  - lésions folliculaires en placard, situées chez la femme au niveau d'une jambe (rasage),
  - lésions hyperkératosiques des paumes des mains et plantes des pieds.

b) Lésions des plis : intertrigo

- Les grands plis (eczéma marginé de Hebra) :
  - pli inguinal +++, plis interfessiers. Ce sont des lésions symétriques/au fond du pli, limitées par un bourrelet circiné, érythémato-vésiculeux plus ou moins net,
  - prurigineux,
  - homme adulte +++.

  E. floccosum, T. rubrum, T. interdigitale.

- Intertrigo digito-plantaire :
  - adulte +++,
  - début 4e espace inter-orteils (IO) : avec desquamation des débris épithéliaux plus ou moins macérés,
  - si tous les espaces sont atteints : pied d'athlète,
  - transmission directe ou indirecte par sol souillé.

  T. interdigitale, T. rubrum, E. floccosum.

3. Onyxis

- Onychomycose unguéale distale +++ : attaque du bord libre de l'ongle, pas de périonyxis ;
- Leuconychie superficielle : attaque directe de la tablette superficielle, pied +++.

T. rubrum, T. interdigitale.

4. Manifestations allergiques des dermatophyties (dermatophytides)

Les dermatophytes peuvent être responsables de manifestations allergiques survenant à distance du foyer infectieux et guérissant avec la disparition de ce foyer. L'aspect clinique principal est une dyshidrose.

E. Bases du diagnostic biologique

Pour les champignons responsables des mycoses superficielles, la base du diagnostic biologique des infections à dermatophytes sera l'examen mycologique. Il doit aboutir à l'identification du champignon isolé sur des critères uniquement morphologiques en se référant à la description de la culture donnée sur le milieu de Sabouraud.

1. Prélèvements

Cette première étape est primordiale. Il faut savoir prélever là où le champignon est le plus vivant :

- Pour les lésions de la *peau glabre*, elles sont grattées à leur périphérie pour recueillir suffisamment de squames permettant l'examen direct et la mise en culture. Le prélèvement se fera à l'aide de vaccinostyle, de grattoirs de Vidal, d'écouvillons si la lésion est suintante. Les squames seront déposées (telles quelles) dans de petites boîtes de Pétri ;
- Pour les *onyxis*, le grattage doit être sous-unguéal en essayant d'arriver au contact du tissu sain et ne pas se contenter de couper les ongles ;
- Pour les *teignes, kérions, sycosis*, il faut arracher les cheveux et les poils, prélever les squames (plus ou moins épaisses) au niveau des lésions du cuir chevelu ;
- Pour les *teignes tondantes*, en raclant les squames de la plaque d'alopécie, on prélève également les cheveux cassés courts qui se détachent facilement ;
- Pour les *kérions :* en stade aigu, prélever le pus, en stade subaigu, prélever cheveux, poils, pus et squames ;
- Dans le cas de *favus*, prélever les cheveux parasités éclairés à la lampe de Wood, les arracher et prendre les fragments qui tapissent le godet favique.

Mis à part les écouvillons, pour lesquels l'examen direct et l'ensemencement doivent être réalisés rapidement, l'examen des autres prélèvements peut être différé (squames, cheveux).

2. Examen direct

C'est une étape essentielle du diagnostic biologique. Il montre la phase parasitaire du champignon. Il se fait toujours après éclaircissement soit à la potasse à 30 %, soit au chloral-lactophénol, soit au noir chlorazole.
Pour les squames, les fragments d'ongles, il met en évidence des filaments mycéliens se segmentant ou non en arthrospores (*fig. 6*).

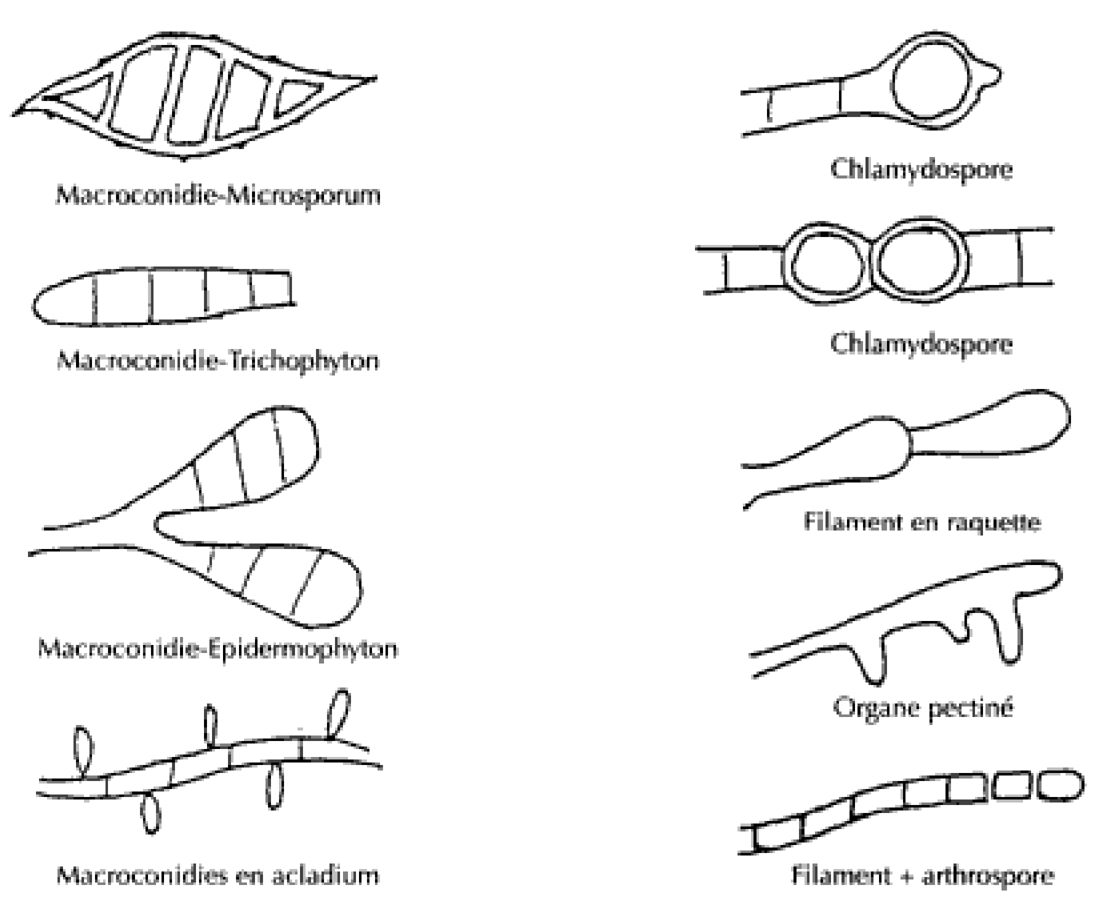


Figure 6. Microscopie

Pour les cheveux et les poils, l'attaque peut être différente selon le dermatophyte et permettra de distinguer plusieurs types de parasitisme pilaire (*fig. 7*). Nous les décrirons tous en insistant sur ceux donnés par *Trichophyton mentagrophytes* et *Microsporum canis*.

- Type favique (*fig. 7A*) : assez nombreux filaments intrapilaires avec, dans la partie distale du cheveu, des vides laissés par le trajet du filament. Exemple : T. *schoeneinii*.
- Type endothrix (*fig. 7B*) : filaments transformés en chaînes de spores bourrant la totalité du cheveu. Regroupe les agents de teignes à contamination interhumaine. Exemples : T. *violaceum, T. soudanense*.
- Parmi le parasitisme endo-ectrothrix :
  - type microïde (*fig. 7E*) dû à T. *mentagrophytes* avec à l'intérieur du cheveu quelques filaments peu nombreux et, à l'extérieur, des chaînettes de spores de 2 microns ;

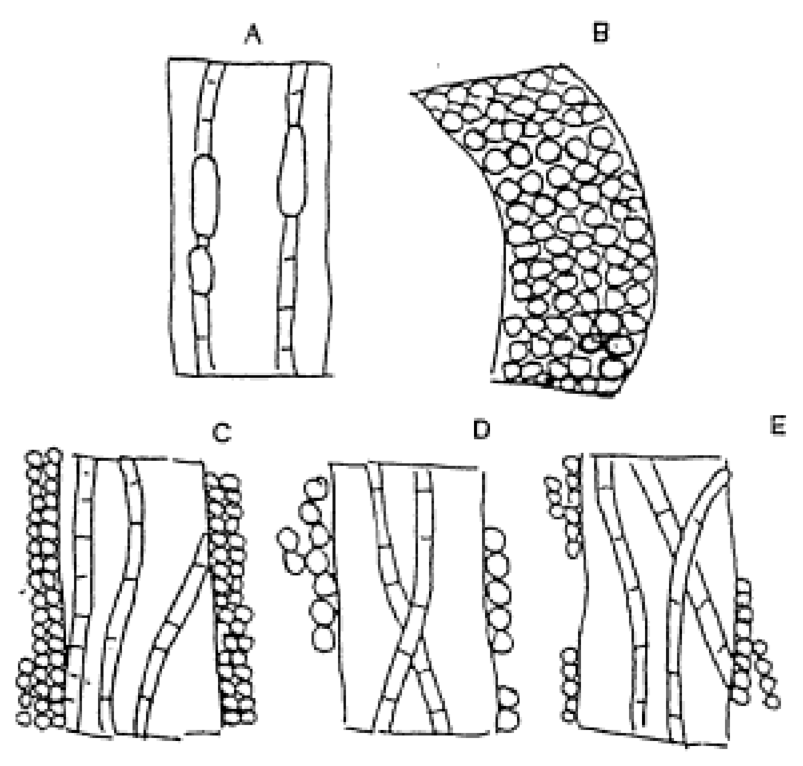


Figure 7. Parasitisme pilaire

– type microsporique (*fig. 7C*) dû à M. *canis* : autour du cheveu, présence d'une gaine continue de petites spores (2 microns) bien tassées les unes contre les autres ;
– le troisième type est mégasporé (*fig. 7D*).

3. Cultures

• Le milieu d'isolement est le milieu de Sabouraud contenant des antibiotiques antibactériens, soit gentamicine, soit chloramphénicol ;
• Un deuxième milieu important est le Sabouraud actidione qui empêche la pousse de la plupart des champignons saprophytes dont les spores se retrouvent facilement à la surface des lésions.

Tous les dermatophytes se cultivent à 25 ou 26 °C. L'ensemencement se fait en général en tube, en raison du délai important de pousse de 1 à 3 semaines. Une culture négative n'est rendue qu'au bout d'un mois d'incubation. L'identification des dermatophytes se fait sur :

• la précocité de la pousse ;
• la morphologie *macroscopique* des colonies :
  – aspect duveteux, plâtreux, poudreux, cérébriforme,
  – pigment pourpre, violet, orangé…,
  – envers de la colonie coloré ou non ;
• aspect *microscopique* (*fig. 6*) où il faut s'attacher à observer :
  – les filaments mycéliens : ramifications, mycélium en raquette, renflements…,
  – les fructifications, c'est-à-dire la morphologie des micro et macroconidies, leur présence ou leur absence, les chlamydospores,
  – les ornementations : organes pectinés.

De façon moins systématique, on pourra rechercher :

• des organes perforateurs (attaque du cheveu *in vitro*) : sur des fragments de cheveux stériles, en atmosphère relativement humide, sera déposé un fragment de

culture à tester. La culture se développe à la surface du cheveu avec présence ou non d'organes perforateurs dans le cheveu ;
- la présence d'une uréase active.

Il faut savoir que, parfois, l'identification est difficile sur le milieu de Sabouraud et que des milieux plus spécifiques permettent une meilleure fructification ou une meilleure pigmentation. Exemples : milieu pomme de terre, carottes (PC), milieu lactrimel de Borelli.

4. Étude des différents dermatophytes

Elle fait intervenir la clinique, l'épidémiologie et la morphologie.

a) Microsporum canis

- Détermine chez l'adulte des épidermophyties (herpès) circinées (+++), chez l'enfant des épidermophyties (herpès) circinées, des teignes tondantes microsporiques à grandes plaques ;
- Parasitisme microsporique (Wood +) ;
- Zoophile (chat +++), pas de problème d'éviction scolaire.

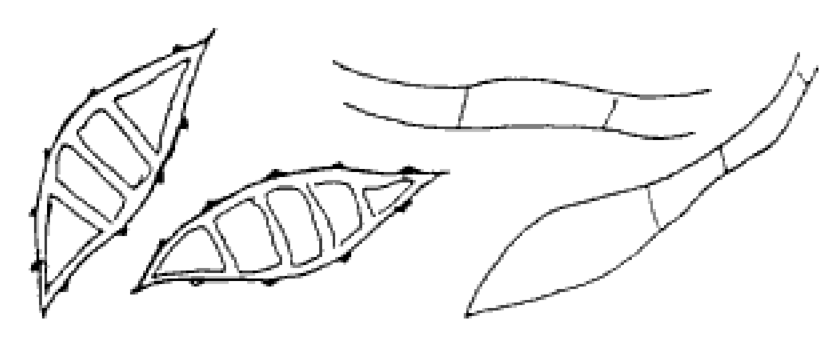


Figure 8. Aspect microscopique de *Microsporum canis*

Mycologie
- Macroscopie : culture rapide qui débute sous forme d'une étoile puis, aspect cotonneux plus ou moins étendu avec envers pigmenté en orangé ou jaune ;
- Microscopie : mycélium épais en raquette, macroconidies (+++) caractéristiques : fuseau à paroi épaisse échinulée à cloisons multiples, extrémités pointues. Si absence, un repiquage sur milieu de Borelli ou PC est nécessaire. Parfois microconidies piriformes.

b) Trichophyton rubrum

- Détermine : onyxis des pieds (+++), épidermophyties (herpès) circinée, eczéma marginé de Hebra, lésions inter-orteils, hyperkératose des mains et des pieds. Attaque des poils très rare (poils des jambes) ;
- Contamination interhumaine, représente 60 % des dermatophytes isolés en France.

Mycologie
- Macroscopie : culture lente avec deux aspects très différents :
  - colonie duveteuse, laineuse, en forme de coupole, blanche avec à l'envers un pigment rouge pourpre, parfois jaune, en cocarde (anneau du pigment) ou diffusible. Ce sont les souches les plus fréquemment rencontrées en France,
  - colonie poudreuse, blanche avec envers pourpre, ce sont les souches dites africaines.

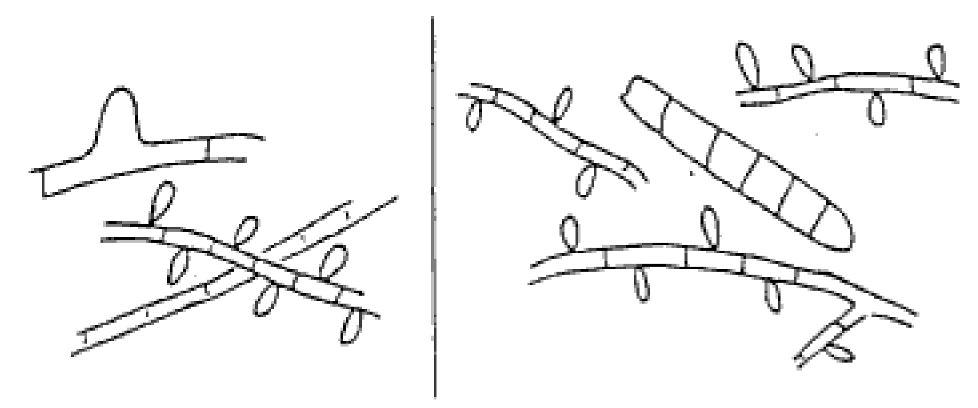


Figure 9. Aspect microscopique de *Trichophyton rubrum*

- Microscopie : les souches dites autochtones n'ont que de rares fructifications : ébauche de fuseau, excroissance en triangle, rares microconidies piriformes portées sur des rameaux courts et fins et disposées en acladium. Il n'y a pas d'organe perforateur. Les souches poudreuses sont beaucoup plus riches : microconidies nombreuses, piriformes ou en massue, en acladium, macroconidies étroites à paroi mince avec de nombreuses cloisons.

c) *Trichophyton mentagrophytes*

Il appartient aux *Trichophyton* microïdes. Il existe de nombreuses variétés dont une est particulière :
- pour certains auteurs, il faut parler de *T. mentagrophytes* variété *interdigitale*. Bien qu'ayant conservé ses caractères morphologiques, cette variété présente par rapport à la souche mère des différences tant au point de vue des lésions cliniques que de l'épidémiologie ;
- pour d'autres auteurs, *T. interdigitale* serait une espèce à part entière différente de *T. mentagrophytes*.

Nous allons donc décrire, dans un premier temps, *T. mentagrophytes* tant au point de vue clinique, épidémiologique et mycologique, puis les caractéristiques plus particulières de la variété *interdigitale*.
- *Le T. mentagrophytes* détermine surtout des lésions inflammatoires :
  - épidermophyties circinées avec vésicules au centre et à la périphérie,
  - sycosis de la barbe,
  - kérion ;
- parasitisme microïde, Wood négatif ;
- zoophile et tellurique.

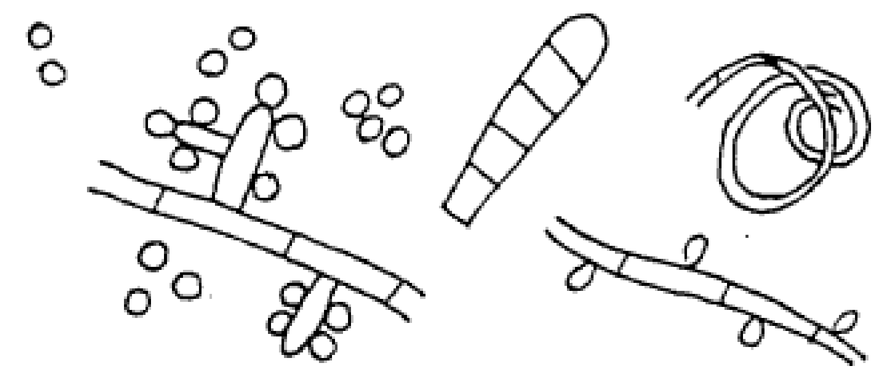


Figure 10. Aspect microscopique de *Trichophyton mentagrophytes*

Mycologie
- Macroscopie : colonies en général poudreuses ou finement granuleuses. L'envers est soit rouge brique, soit jaunâtre, soit brun ;
- Microscopie très riche : filaments à angle droit porteur de microconidies rondes très abondantes, filaments en surface portant des microconidies piriformes, vrilles, macroconidies allongées, à paroi mince :
  – formation d'organes perforateurs,
  – présence d'une uréase.

d) Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale ou Trichophyton interdigitale

- Détermine des intertrigos des grands plis (+++), des petits plis (+++), des onyxis ;
- Anthropophile ;
- La mycologie est identique à la souche mère ;
- La formation d'organes perforateurs permet le diagnostic différentiel avec *Trichophyton rubrum*.

e) *Epidermophyton floccosum*

- Détermine : des intertrigos des grands plis, (inguinal +++) et des espaces interdigitaux plantaires, des herpès circinés ;
- N'attaque jamais les poils ;
- Anthropophile.

Mycologie
- Macroscopie : pousse rapide, disque poudreux ocre verdâtre, légèrement étoilé au départ, puis la colonie se plisse et devient cérébriforme avec un léger duvet blanc ;
- Microscopie : à observer rapidement après le début de la pousse : absence de microconidies, macroconidies en massue, groupées, à paroi mince comportant des logettes. Phénomène de pléomorphisation rapide avec transformation des filaments et des macroconidies en chlamydospores formant des chaînes.

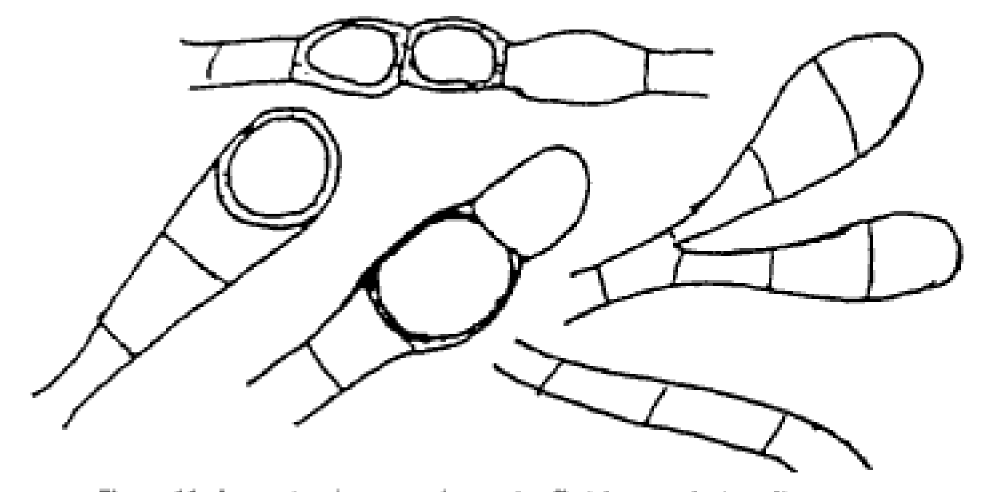


Figure 11. Aspect microscopique de *Epidermophyton floccosum*

F. Bases du traitement

Il est différent pour une teigne, une lésion de la peau glabre ou un onyxis. Dans tous les cas, il sera long : trois semaines à un mois minimum.

1. Teignes

Le traitement associe :
- la griséofulvine *per os* qui s'incorpore à la kératine au bout de six à huit semaines ;
- un traitement local à base d'imidazolés.

Le kétoconazole peut éventuellement être prescrit en remplacement de la griséofulvine.

2. Épidermophyties

En règle générale, elles ne bénéficient que d'un traitement local :
- les imidazolés à usage local (*tab. 4*) ;
- la terbinafine en crème Lamisil® ;
- la ciclopiroxolamine : Mycoster®.

3. Onyxis

Le traitement sera long, six mois au minimum :
- soit un traitement général par la terbinafine Lamisil®, qui est actuellement la molécule de choix, associé à un traitement local (imidazoles, ciclopiroxolamine, amorolfine) ;
- soit un traitement local pour les onyxis sans atteinte matricielle. On utilise soit des vernis, soit des crèmes et dans ce cas, on peut compléter par un limage de l'ongle ou un traitement par l'urée des zones atteintes pour permettre une meilleure pénétration de l'antifongique.

4. Conclusion

Les infections à dermatophytes constituent une pathologie courante. Les champignons responsables sont nombreux et variés. Si leurs caractères morphologiques restent la base de leur identification, leur diagnostic biologique ne peut dissocier pour une même espèce les arguments mycologiques, cliniques et épidémiologiques.

L'essentiel de la question

Parmi les mycoses à levures, nous avons abordé les candidoses et la cryptococcose. Les candidoses cutanéo-muqueuses constituent une pathologie courante. Leur diagnostic biologique ne doit pas poser de problème dans la mesure où le prélèvement est facile à réaliser. L'arsenal thérapeutique est relativement important avec de nombreuses formes topiques. À l'opposé, les candidoses systémiques sont toujours graves et surviennent chez des patients présentant plusieurs facteurs de risque. La mise en évidence du champignon est souvent difficile car elle nécessite des prélèvements profonds peu réalisables. Les antifongiques systémiques disponibles sont plus diversifiés. Les Candida sont des endosaprophytes. Si *Candida albicans* reste l'espèce prédominante, de nouvelles espèces émergent nécessitant d'une part, un diagnostic mycologique précis et d'autre part, la réalisation d'un antifongigramme en raison notamment d'une moindre sensibilité de certaines de ces espèces aux antifongiques.

La cryptococcose à *Cryptococcus neoformans* reste encore une complication opportuniste du patient VIH+. Sa forme clinique habituelle est la méningo-encéphalite. Le diagnostic biologique est bien codifié avec l'isolement du champignon, son identification, et la recherche d'antigènes circulants.
Les aspergilloses sont des mycoses opportunistes dues, dans 80 à 90 % des cas, à *Aspergillus fumigatus*, champignon filamenteux fréquent dans le milieu extérieur. La principale voie de pénétration chez l'homme est aérienne. L'appareil respiratoire est donc le plus fréquemment concerné. Les entités cliniques sont variées : aspergillome, surinfection aspergillaire des BPCO, aspergillose invasive du patient neutropénique, aspergillose sinusienne et aspergillose immuno-allergique. Le diagnostic biologique repose sur la mise en évidence du champignon et son diagnostic morphologique, complétés par le dosage des anticorps ou la recherche d'antigènes circulants en fonction du statut immunitaire du patient. Le rôle pathogène de l'*Aspergillus* isolé en culture doit tenir compte des données clinicobiologiques. Le traitement repose sur plusieurs molécules.
Les dermatophytes sont des champignons filamenteux kératinophiles déterminant des mycoses cutanées siégeant sur la peau glabre et les phanères (ongles, cheveux, poils...). Suivant les espèces, leur contamination est, soit interhumaine, soit zoophile, soit tellurique. En France, *Trichophyton rubrum* est l'espèce la plus fréquemment isolée. Les dermatophytoses sont facilement accessibles au traitement. Qu'il soit prescrit oralement ou en topique, ce dernier est toujours long. Le diagnostic biologique ne peut dissocier pour une même espèce les arguments mycologiques, cliniques et épidémiologiques.

Pour en savoir plus

- Association française des professeurs de parasitologie Ann O'Fel. *Parasitologie Mycologie*, 6ᵉ éd., format utile, C&R 1998.
- Badillet G. *Dermatophyties et dermatophytes*, Atlas clinique et biologique, éd. Varia, Paris.
- Badillet G., de Bièvre C., Guého E. *Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes*, Atlas clinique et biologique, (tomes I et II), éd. Varia, Paris.
- Chabasse D., Guiguen C., Contet-Audonneau N. *Mycologie médicale*, éd. Masson, Paris 1999.
- Grillot R. *Les mycoses humaines : démarche diagnostique*, col. Option Bio, éd. Elsevier, Paris 1996.
- Koenig H. *Guide de mycologie médicale*, éd. Ellipse, Paris 1995.

Amibose

S. DEBLOCK, T. DURIEZ
Laboratoire de parasitologie, UFR de pharmacie, Lille.

Les recommandations de nomenclature préconisent pour les maladies parasitaires le suffixe « ose » ; il conviendrait donc d'utiliser le terme « amibose » ou « amœbose » et non « amibiase ».
L'amibe dysentérique Entamœba histolytica est l'agent pathogène d'une maladie du tube digestif, la dysenterie amibienne, qui affecte le gros intestin ; elle évolue par crises. Elle s'aggrave parfois de complications viscérales graves au niveau du foie le plus souvent, toujours secondaires à une localisation intestinale. Ces complications sont souvent de très mauvais pronostic en l'absence de traitement spécifique. Le diagnostic étiologique de l'affection intestinale est un diagnostic parasitologique direct mettant en évidence le parasite dans les selles du malade. Celui de l'amibose hépatique est un diagnostic indirect, immunologique. La parasitose est cosmopolite, mais plus commune dans les régions chaudes, humides et très peuplées du globe. Les cas détectés en France sont essentiellement des cas d'importation. Les médicaments de la série des nitro-5-imidazolés ont révolutionné et beaucoup simplifié la thérapeutique de l'affection jadis à base d'émétine.
La biologie du parasite tient sous sa dépendance l'épidémiologie, la pathogénie, la clinique et le diagnostic de la maladie qu'il détermine. Il convient de la préciser en premier lieu.

I. Épidémiologie

A. Biologie du parasite (cycle évolutif) – Morphologie

Entamœba histolytica est un protozoaire rhizopode toujours parasite, polymorphe, dont l'habitat normal est la lumière du gros intestin de l'homme. Il s'y nourrit par phagocytose de débris divers prélevés au contact de la muqueuse, et s'y multiplie selon deux cycles différents :
- le premier cycle, normal, assure la multiplication, la transmission de l'espèce et sa pérennité ; le parasite s'y comporte en commensal ;
- le second cycle, inhabituel, facultatif et temporaire, se greffe obligatoirement sur le premier. Il rend le parasite invasif et pathogène. Ce cycle paraît inutile à la survie de l'espèce du parasite.

Les modalités de ces deux cycles biologiques sont les suivantes :
Lors du *cycle commensal*, l'amibe dysentérique se présente sous la forme d'un trophozoïte de petite taille de type *minuta*, mesurant 15 µm de diamètre environ. Le noyau cellulaire est caractéristique du genre *Entamœba*, avec de petits amas chromatiniens périphériques centrés par un nucléole punctiforme. La structure du noyau est invisible sur la cellule vivante.
L'amibe *minuta* se multiplie par mitoses. Un certain contingent de la population amibienne du côlon est capable de s'enkyster à l'intérieur d'une enveloppe fine, rigide et réfringente, relativement résistante aux agents naturels de destruction. Le kyste est éliminé passivement du tube digestif, lors des exonérations du porteur, mêlé aux selles. Il est sphérique, mesure entre 10 et 14 µm de diamètre et contient à maturité 4 petits noyaux de même structure que celui du trophozoïte et un bâtonnet (cristalloïde).

Ce kyste est directement infectieux dès son émission. C'est la forme de résistance et de dissémination du parasite dans la nature ; la virulence du kyste dépend des conditions du milieu. Elle est en moyenne d'une dizaine de jours dans l'eau, à + 20 °C, elle est diminuée si la température et le nombre de bactéries s'élèvent, ou en cas de sécheresse. L'infestation d'un sujet sain a lieu par ingestion des kystes avec l'alimentation (eaux de boisson, crudités) ou par l'intermédiaire des mains sales. Au contact des sucs digestifs, l'enveloppe kystique se rompt et libère une amœbule qui, après une division nucléaire des 4 noyaux, fournit 8 amœbules (type *minuta*) qui établissent la population définitive des parasites dans le tube digestif.
Lors du *cycle pathogène*, l'amibe dysentérique subit l'équivalent d'une métamorphose morphologique et comportementale, déclenchée sous l'influence de facteurs physiopathologiques encore mal élucidés régnant à un moment donné dans la lumière du côlon d'un porteur des formes *minuta*.
L'amibe se multiplie dès lors par mitoses sous une forme de grande taille relative, mesurant entre 15 et 20 ou entre 30 et 35 µm de diamètre, dite *magna* ou *histolytica*. Elle perd la faculté de fournir des kystes mais par activation d'enzymes protéolytiques puissantes, elle devient capable d'agresser les tissus vivants de son hôte, et de provoquer des abcès ; elle peut aussi phagocyter des hématies. Cette hématophagie, visible sous le microscope, signe le pouvoir pathogène du trophozoïte type *histolytica*.
Ces transformations sont temporaires ; après plusieurs semaines ou plusieurs mois, l'état de crise rétrocède spontanément et les amibes *magna* perdent leur pouvoir d'agression et reprennent la forme *minuta* initiale. Le cycle pathogène intestinal est cependant capable de se renouveler chez un même sujet et de la même façon que la première fois, être à l'origine de rechutes dysentériques ou d'essaimages par voie sanguine vers divers points de l'organisme.

B. Réservoir parasitaire – Mode de transmission – Modes épidémiques – Répartition géographique

Le réservoir parasitaire est constitué par l'espèce humaine et, plus particulièrement par les porteurs de kystes, c'est-à-dire les sujets asymptomatiques, les malades en période de rémission, les convalescents, sans distinction d'âge, de sexe, ni d'origine. Il n'existe pas d'immunité naturelle ou acquise conférant la protection. Ces propriétés expliquent la banalité de l'affection dans les zones d'endémie.
Il s'agit d'une maladie liée au péril fécal – au même titre que l'hépatite virale, la poliomyélite, les salmonelloses, les shigelloses ou le choléra – à transmission simple, intestinale, soit directement par les mains sales soit, plus communément, indirectement par l'eau de boisson ou les aliments crus souillés de déjections humaines contenant des kystes (les pratiquants de l'homosexualité constituent, vis-à-vis des parasitoses intestinales à cycle direct, transmises par des kystes, telles que les amiboses, des « populations à risque »). Les trophozoïtes, incapables de survivre dans le milieu extérieur suite à leur refroidissement, leur dessiccation ou leur éclatement dans l'eau, ne jouent pratiquement aucun rôle dans la transmission de la parasitose, sauf circonstance très exceptionnelle, toujours anecdotique.
Maladie infectieuse, l'amibose évolue sur le mode endémique au sein des populations rurales ou urbaines des pays intertropicaux, non ou mal pourvues en réseaux

d'adduction d'eau potable de bonne qualité et en réseaux d'égouts collecteurs des eaux usées. Les principaux foyers se situent en Amérique centrale, en Afrique, en Asie du Sud et du Sud-Est.
On a également décrit des épidémies localisées d'amibose éclatant dans des petites collectivités, à partir d'un porteur asymptomatique tel qu'un employé aux cuisines par exemple. De micro-épidémies familiales naissent parfois au contact d'un malade ou d'un convalescent avant traitement.

C. Pathogénie

1. Causes individuelles favorisantes

D'un point de vue individuel, s'il existe des porteurs asymptomatiques permanents, on rencontre aussi des sujets qui déclareront une amibose-maladie lors de leur première infestation. Favorisent l'éclosion du cycle pathogène de l'amibe dysentérique toute agression déterminant des lésions ou des réactions inflammatoires de la muqueuse colique ainsi que toute cause extrinsèque ou intrinsèque d'affaiblissement de la résistance naturelle de l'organisme.

2. Rôle de la flore bactérienne associée

L'expérimentation animale a démontré que la pathogénicité de l'amibe *histolytica* est tributaire de la flore bactérienne d'accompagnement, souvent banale, mais sans laquelle elle ne saurait s'exprimer. Une flore pathogène éventuelle est un facteur d'aggravation de l'amibose-maladie, l'association amibose-salmonellose est fréquente.

3. Lésions élémentaires intestinales et tissulaires

La lésion élémentaire du côlon est constituée par l'abcès amibien. Ce dernier est toujours multiple et siège tout le long du cadre colique, avec une préférence pour les deux extrémités, cœliale et rectosigmoïdienne. Il intéresse la muqueuse dans laquelle se creuse un étroit pertuis, et s'étend plus largement dans la sous-muqueuse à partir de cette porte d'entrée, abcès classiquement comparé à un « bouton de chemise ».
Le parasite est présent en périphérie des lésions, au contact des tissus sains, tandis que le centre de l'abcès est envahi par des bactéries intestinales. Plusieurs micro-abcès entrent en confluence et font naître des ulcérations de 1 à 2 cm de diamètre, après 3 ou 4 semaines d'évolution, les formes *histolytica* réintègrent la lumière intestinale, reprennent l'aspect *minuta* et retrouvent la capacité de s'enkyster. Les abcès vont se cicatriser.
Les parasites des lésions intestinales sont susceptibles de s'emboliser par voie lymphatique ou sanguine et d'aller coloniser en premier lieu le parenchyme hépatique puis d'autres localisations comme le parenchyme pulmonaire…, y déterminant le même type de lésion primaire, c'est-à-dire des micro-abcès secondairement confluents avec destruction plus ou moins large du parenchyme, de l'ordre de un à plusieurs centimètres de diamètre. Les abcès extracoliques ne permettent pas le retour à la lumière colique, il n'y aura donc pas de guérison spontanée de ces abcès.

4. Évolution de la parasitose

L'amibiase intestinale non traitée évolue par crises récidivantes. Cette chronicité est génératrice d'un dysfonctionnement colique définitif ; elle laisse planer un risque permanent de complications viscérales toujours possible, dont le pronostic est beaucoup plus sombre en l'absence de traitement spécifique : l'abcès amibien du foie engendre 50 % de mortalité, parfois davantage, selon la virulence des souches.

II. Diagnostic biologique

A. Orientation du diagnostic

Le diagnostic de certitude d'une amibose est apporté par l'examen parasitologique. Il s'étaye idéalement par la connaissance préalable de diverses notions concernant :

- *l'anamnèse*, qui essaie de préciser l'origine géographique du malade, un séjour en pays d'endémie, la possibilité d'un contage, la prise antérieure éventuelle de médications spécifiques ou non, avec la date des dernières prises ;
- *le diagnostic clinique*. Il est évoqué :
  - dans le cas d'une *amibose dysentérique aiguë*, par le constat de coliques, d'épreintes et de ténesmes accompagnés d'une dysenterie constituée de selles fécales entrecoupées de « crachats rectaux » émis 10 à 15 fois par jour. Les formes atténuées diarrhéiques avec 4 à 8 selles fécales par jour sont plus fréquentes. Si une rectosigmoïdoscopie est pratiquée, elle montre des ulcérations isolées « en coup d'ongle » ou groupées. Le patient est généralement apyrétique,
  - dans le cas d'une *amibose en phase chronique*, par le constat de troubles aspécifiques de la digestion et du transit,
  - dans le cas d'une *amibose extracolique*, le plus souvent *hépatique*, par une altération grave de l'état général accompagnée d'une fièvre, de douleurs de l'hypocondre droit et d'une hépatomégalie. L'imagerie médicale (échographie, scanner) montre l'abcès. Le laboratoire notera une accélération de la vitesse de sédimentation globulaire, une formule sanguine caractéristique d'une maladie infectieuse, (leucocytose à polynucléaires neutrophiles) et pas d'hyperéosinophilie, à la condition qu'il n'existe pas d'helminthiase associée et des tests d'intégrité fonctionnelle hépatique peu perturbés (en l'absence de maladie intercurrente).

La conduite de l'examen parasitologique au laboratoire n'est pas exactement la même dans chacun des cas cliniques évoqués ci-dessus.

- *La crise aiguë* de dysenterie amibienne se diagnostique par coproscopie, par la mise en évidence des formes *histolytica* pathogènes dans les selles muco-sanglantes du malade ou dans les produits de raclage des lésions de la muqueuse rectale, obtenus sous rectosigmoïdoscopie ;
- *L'amibose en phase chronique* se diagnostique par la mise en évidence, dans des selles d'aspect normal ou subnormal, des kystes amibiens et, beaucoup plus difficilement, par l'identification des formes *minuta* du parasite ;

- *Les complications viscérales* de l'amibose telles que l'amibose hépatique, leur forme cliniquement la plus fréquente, sont confirmées au laboratoire par la sérologie spécifique. Les examens parasitologiques sont alors accessoires.

B. Cas de l'amibose intestinale

1. Diagnostic parasitologique direct

Les selles du malade peuvent présenter trois aspects différents : muco-sanguinolent, fécal, et diarrhéique.

- Dans le cas des *selles muco-sanguinolentes,* celles-ci sont peu abondantes en volume, peu fécales, on parle de « crachat rectal », fréquemment renouvelées dans les 24 heures et dépourvues de pus. C'est le cas le plus favorable pour mettre en évidence les formes *histolytica* hématophages qui signent le diagnostic d'amibose colique aiguë en évolution.
  L'examen sera effectué le plus rapidement possible après l'émission des selles, avant refroidissement et dessiccation, et à 37 °C. On prélève le mucus strié de sang en divers endroits des selles et l'on pratique un examen coproscopique direct entre lame et lamelle, sans addition de réactif. On réitère l'examen plusieurs fois si les premières préparations sont négatives. Les amibes entre 15 et 30 µm de diamètre à exo et endoplasme nettement différenciés, à pseudopodes vivement formés et ayant phagocyté de une à plusieurs hématies sont caractéristiques. Un diagnostic différentiel est à porter en présence de cellules macrophages ayant phagocyté des globules rouges ou, éventuellement, avec *Entamœba coli*, rarement présente dans le type de selles afécales émises par le malade, mais ne contenant jamais d'hématies intracytoplasmiques. Si l'examen du prélèvement ne peut être extemporané, réaliser un frottis fixé puis coloré pour préserver l'intégrité des formes *histolytica*.
- Dans le cas de selles *fécales moulées*, le malade se trouve en période de chronicité ou de rémission. Les selles ne contiennent pas de formes *histolytica* ; la présence de formes *minuta* est problématique. Il y a lieu de rechercher les kystes à l'examen direct des selles au Lugol par exemple, et après application de deux méthodes de concentration des kystes des selles, l'une par sédimentation en milieu diphasique telle que les méthodes de Thébault-Valentin, de Carles-Berthélémy, de Telemann-Rivas-Bailanger par exemple, et l'autre par lévigation telle que la méthode de Faust *et al* au sulfate de zinc. Il existe des techniques associant les deux principes (méthode de Junod).
  La découverte de kystes subsphériques entre 10 et 14 µm de diamètre à 4 noyaux, avec parfois un cristalloïde épais ou une vacuole iodophile discrète, signe la présence de l'amibe dysentérique, forme *minuta*, mais ne résoud pas le problème de la pathogénicité réelle du parasite ainsi mis en évidence chez le sujet. Rappelons l'existence d'amibes non pathogènes ayant la morphologie de *Entamœba histolytica* et retrouvées chez des sujets « semeurs de kystes ». Ces amibes peuvent appartenir à l'espèce *Entamœba dispar*.
  Le diagnostic différentiel des kystes d'amibes parasites de l'homme est à porter vis-à-vis des espèces *Entamœba coli, Entamœba hartmanni, Entamœba polecki*,

Iodamœba butschlii et *Endolimax nana*, ainsi que de *Blastocystis hominis*. Les critères du diagnostic portent sur la taille des kystes, leur contenu, et la morphologie nucléaire fine.

- Le cas des selles *fécales diarrhéiques* est le plus défavorable au diagnostic parasitologique.

  Les kystes sont rares ou absents, souvent immatures donc atypiques avec 1 ou 2 noyaux seulement et une vacuole iodophile discrète. La présence de trophozoïtes d'amibes, de petite taille relative entre 5 et 15 µm selon l'espèce et décelés sur des selles fraîchement émises observées à 37 °C sans réactif, pose le problème de leur identification, difficile à établir sans expérience. Aucune de ces amibes n'est hématophage. Les critères discriminatifs sont la taille moyenne, le déplacement, la résistance au refroidissement ou dans l'eau de ville, la morphologie nucléaire qui différencie les genres. Cette dernière n'est bien observable qu'après coloration en masse des selles par le MIF de Sapero par exemple, ou après fixation-coloration de frottis humides sur lame par une méthode rapide telle que celle de Wheatley au sublimé, ou la méthode de référence à l'hématoxyline-ferrique. L'examen de frottis n'est toutefois significatif que sur des selles spontanément riches en parasites à l'examen direct.

  Les difficultés de ce diagnostic conduisent à préconiser le renouvellement de l'examen coprologique à quelques jours d'intervalle, de façon à déceler une émission spontanée de formes kystiques, souvent de diagnose plus aisée que les seuls trophozoïtes.

Remarques

- Les amibes se multiplient en culture *in vitro* à 37 °C sur milieux organiques riches. On pourrait être tenté de multiplier des parasites trop rares dans un prélèvement, pour favoriser leur observation.

  L'avantage de cet enrichissement est plus théorique que pratique : La méthode ne révèle pas de parasites inobservés à l'examen direct à frais. La culture fournit dans tous les cas des formes *minuta* de l'amibe dysentérique et jamais de kystes ; elle n'est pas spécifique et favorise simultanément la multiplication des trophozoïtes d'amibes d'autres espèces présentes dans l'inoculum, les grains d'amidon phagocytés gênent l'observation microscopique des détails cytologiques, nécessaires au diagnostic différentiel des genres et espèces. Les milieux d'isolement et de développement les plus courants sont constitués de milieux diphasiques selon Boeck (à l'œuf coagulé surmonté de sérum de poulain glucosé), ou selon Jobell et Laidlaw (au sérum de poulain coagulé surmonté d'albumine d'œuf diluée), l'un et l'autre milieux supplémentés de grains d'amidon de riz au moment de l'ensemencement. Incuber à 37 °C et examiner avant le 4e jour ;
- L'inoculation à l'animal (chat, hamster), bien que théoriquement possible, n'est jamais utilisée pour le diagnostic ;
- En cas de suspicion d'amibose colique, non confirmée par le laboratoire au premier examen coprologique, il y a lieu de renouveler celui-ci deux fois à un ou deux jours d'intervalle, ou lors d'un épisode intestinal aigu, avant de conclure à une négativité ;
- Chez les malades constipés ou à transit normalement accéléré, on préconise le procédé de la réactivation au sulfate de soude en dose non purgative (moins de

10 g). Ce sel accélère le transit, favorise la muco-sécrétion de la muqueuse intestinale, ce qui incite les parasites à se multiplier ou à s'enkyster. Leur recherche est donc facilitée.

2. Recherche d'antigènes parasitaires

Quand le diagnostic parasitologique est négatif, bien que l'anamnèse et la clinique soient évocatrices, des techniques immunologiques telles que l'Elisa peuvent être utilisées pour détecter la présence de copro-antigènes d'*Entamœba histolytica* dans les selles du sujet. Elles emploient des anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques du parasite, exemple du test *Entamœba histolytica* par immunoprécipitation

La recherche d'anticorps sériques dirigés contre l'amibe est généralement décevante et ne permet pas de différencier les malades des porteurs sains d'*Entamœba histolytica* ou d'autres amibes non pathogènes.

C. Cas de l'amibose tissulaire extracolique

1. Diagnostic parasitologique direct

Lors d'une amibose tissulaire telle que l'abcès amibien du foie, le laboratoire peut avoir à pratiquer un examen coprologique parasitaire ou un examen de pus de ponction.

La positivité de l'examen coprologique sur des selles provenant d'un transit normal le plus souvent est un argument favorable de l'étiologie amibienne des lésions du parenchyme hépatique, mais n'en constitue pas la preuve absolue. Par ailleurs, sa négativité n'infirme rien, un patient souffrant d'amibiase extracolique peut s'être débarrassé des amibes *minuta* initialement présentes dans son côlon.

L'examen parasitologique d'un pus de ponction est souvent négatif, les amibes *magna* se situant aux abords immédiats des tissus sains, cette position est peu favorable à leur présence en abondance dans les pus prélevés ; il faudra rechercher les amibes *histolytica* dans les dernières portions du prélèvement. La négativité n'infirme pas l'étiologie amibienne de l'abcès.

2. Diagnostic indirect

L'examen de laboratoire significatif dans l'amibose tissulaire est la sérologie, pratiquée sur l'antigène homologue (amibes dysentériques de culture) engagé dans des réactions d'immunoprécipitation soit en gélose (Ouchterlony, immunoélectrophorèse de Grabar), soit en acétate de cellulose (immunoélectrosynérèse), dans des réactions d'agglutination et d'hémagglutination conditionnée, d'immunofluorescence indirecte ou d'Elisa. L'examen immunologique constitue une urgence en cas d'abcès amibien hépatique.

L'immunologie est également indispensable pour contrôler l'efficacité du traitement spécifique du malade, et témoigner d'éventuelles rechutes.

III. Traitement

Thérapeutique, contrôle de la cure, prophylaxie

Le diagnostic d'une amibose intestinale aiguë à *Entamœba histolytica* confirmée au laboratoire, et plus encore celui d'une amibose tissulaire confirmée sérologiquement, doivent toujours être suivis sans délai d'une thérapeutique spécifique par des amœbicides tissulaires tels que les nitro-5-imidazolés dont le chef de file fut le métronidazole (Flagyl®), et ses satellites modernes, le secnidazole (Secnol®), l'ornidazole (Tibéral®) et le tinidazole (Fasigyne®) ; métronidazole et ornidazole sont utilisables en injections parentérales dans les formes de la maladie les plus graves qui peuvent constituer des urgences diagnostiques et thérapeutiques.

Après guérison des signes cliniques, l'administration d'amœbicides de contact tels l'Intétrix® (tiliquinol + tilbroquinol) pendant 1 semaine ou le secnidazole pendant 3 jours est préconisée pour stériliser le réservoir colique du parasite.

L'efficacité du traitement d'une amibiase extracolique est contrôlée immédiatement par la diminution de la VS et la disparition des signes cliniques : fièvre, douleur. À plus long terme, la négativation de l'imagerie et la diminution de la réponse immunitaire confirmeront la guérison.

L'efficacité du traitement sur les formes luminales coliques est contrôlée par des coproscopies (recherche de kystes).

La désinfection de l'environnement, des objets souillés ou du linge aura lieu, selon une question d'opportunité, par la chaleur ou des substances chimiques (formol, hypochlorite, permanganate, crésol…).

La lutte contre le péril fécal, le traitement de l'eau (filtration stérilisante, ébullition), les mesures d'hygiène fécale, manuelle et alimentaire constituent l'essentiel de la politique prophylactique de l'amibose.

L'essentiel de la question

Épidémiologie

L'amibose (amibiase) est due à un protozoaire, *Entamoeba histolytica,* commensal du côlon de l'homme, qui peut devenir pathogène.

Le cycle commensal comprend une forme végétative intraluminale dite *minuta* et une forme de survie à l'extérieur : le kyste, le porteur est asymptomatique.

Le cycle pathogène correspond à une modification morphologique et biologique de l'amibe qui lui confère des capacités de nécrose des tissus, provoquant la formation d'abcès coliques à partir desquels une dissémination est possible.

La contamination est féco-orale, le plus souvent par l'intermédiaire de l'eau et des aliments.

La parasitose est cosmopolite, la maladie est principalement tropicale, les rechutes sont la règle.

Diagnostic

Le diagnostic est orienté par la clinique : diarrhée, dysenterie lors de l'affection colique ; fièvre, douleur et signes locaux dans les cas d'affections extracoliques.

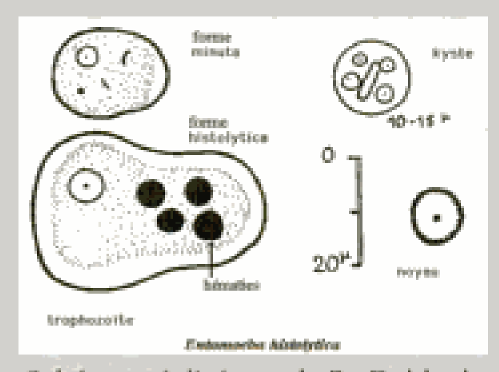
L'affection colique est décelée par la mise en évidence du parasite dans les selles ; dans un crachat rectal, on recherchera la forme *histolytica* très fragile, dans une selle diarrhéique : la forme *minuta*, dans une selle moulée : le kyste. Dans les deux derniers cas, il convient de faire un diagnostic différentiel avec les amibes commensales non pathogènes.

Les affections extracoliques sont détectées par des techniques immunologiques (Elisa) objectivant des anticorps spécifiques.

Traitement et prophylaxie

Le traitement des épisodes symptomatiques se fait par les 5-nitro-imidazolés (métronidazole, tinidazole) en cures de 7 jours. Après disparition des signes cliniques, un traitement de contact (Intétrix®) permettra la stérilisation du réservoir colique d'amibes.

La prophylaxie repose sur une hygiène fécale, alimentaire et manuelle.



Schémas réalisés par le Pr. Deblock

Figure 1. Morphologie de *Entamœba histolytica*

Pour en savoir plus

- AFECT. « Dérivés nitrés de l'imidazole » in *Traité de chimie thérapeutique*. Vol V, t II. Technique et documentation, Paris 2000 : 311-32.
- Léger N., Danis M. « Amibes et amibiases. » Encyclopédie médicale et chirurgicale. Maladies infectieuses. Éditions Techniques, Paris 1995 : 8-500-A-10.
- Nozais J.-P., Datry A., Danis M. *Traité de parasitologie médicale*. Pradel, Paris 1996.
- Wéry M. *Protozoologie médicale*. Agence francophone pour l'enseignement et la recherche et De Boeck Université. Pradel, Paris 1995 : 249-64.

Giardiose

S. DEBLOCK, T. DURIEZ
Laboratoire de parasitologie, UFR de pharmacie, Lille.

I. Épidémiologie

A. Nature et biologie du parasite (cycle évolutif)
B. Réservoir parasitaire – Mode de transmission
C. Mode épidémique – Répartition géographique
D. Pathogénie

II. Diagnostic biologique

A. Signes d'orientation
B. Diagnostic direct (parasitologique)
C. Diagnostic indirect (sérologique)

Les recommandations de nomenclature préconisent pour les maladies parasitaires le suffixe « ose » ; il conviendrait donc d'utiliser le terme « giardiose » et non « giardiase ».
La giardiose est une maladie parasitaire due à la prolifération dans l'intestin grêle proximal d'un protozoaire flagellé, Giardia intestinalis, traditionnellement décrit comme spécifique de l'homme. Actuellement, on envisage la possibilité d'un réservoir de virus animal domestique et sauvage. Il ne met jamais en jeu la vie du malade mais affecte, à des degrés divers, la motricité du tube digestif et l'assimilation des aliments. La parasitose non traitée évolue sur un mode chronique éventuellement ponctué d'états de crise. Il n'y a pas de complication viscérale. Le diagnostic étiologique est un diagnostic parasitologique direct par coproscopie. L'immunologie est généralement inutile.
Il existe de nombreux porteurs asymptomatiques jouant le rôle de réservoir parasitaire de l'affection ; celle-ci est cosmopolite, et existe en France à l'état endémique. Le parasite est sensible aux nitro-5-imidazolés.

I. Épidémiologie

A. Nature et biologie du parasite (cycle évolutif)

- *Giardia intestinalis* est un protozoaire flagellé diplomonadiné au corps dédoublé symétrique, piriforme, en forme de cerf-volant. Il mesure entre 10 et 20 × 6 et 10 µm et possède 2 noyaux antérieurs symétriques par rapport à l'axe longitudinal, 2 corps parabasaux submédians, en virgule, et deux fois 4 flagelles symétriques. La moitié antérieure du corps est creusée d'une dépression cupuliforme qui joue le rôle d'un disque adhésif lorsqu'elle coiffe un entérocyte. La cellule est mobile par brefs à-coups ;
- Le trophozoïte de *Giardia* peut s'enkyster. Le kyste est ovoïde, symétrique, mesure entre 10 et 13 × 8 et 9 µm et présente 2 noyaux, un amas flagellaire axial, 2 corps parabasaux ;
- Tous ces éléments sont bien visibles au microscope, à frais ou dans une goutte de Lugol ;
- Le cycle biologique du parasite est plus simple que celui de l'amibe dysentérique mais fait appel aux mêmes principes de base. Le trophozoïte se multiplie par scissiparité binaire dans la lumière du grêle, au contact de la muqueuse. Très abondant, il tapisse la surface de celle-ci et entrave les phénomènes d'absorption. Des trophozoïtes peuvent s'enkyster en présence de sels biliaires, et les kystes se laissent éliminer du tube digestif avec les selles du porteur. Une maturation de 24 heures au minimum est nécessaire dans le milieu extérieur pour que le kyste devienne infestant. Le parasite enkysté subit une division binaire et présente dès lors 4 noyaux. Après ingestion par un sujet neuf, 2 trophozoïtes éclosent sous l'action séquentielle des sucs digestifs, et le cycle parasitaire recommence. Le délai de maturation de 24 heures minimise les cas d'auto-infestations possibles. L'infectivité des kystes se maintient dans l'eau pendant un mois. Le rôle des trophozoïtes dans la transmission de la parasitose est nul.

B. Réservoir parasitaire – Mode de transmission

L'épidémiologie générale de la giardiose est la même que celle de l'amibose. C'est donc une maladie du péril fécal, à transmission féco-orale indirecte, souvent hydrique, par l'intermédiaire des mains sales ou de l'alimentation polluée de déjections humaines. L'homme, et en particulier les enfants, en constituent le réservoir parasitaire.

C. Mode épidémique – Répartition géographique

La maladie est cosmopolite et évolue sur le mode endémique au sein de la plupart des populations de tous les climats, prévalence de 1 à 7 % dans les pays industrialisés ; la giardiose autochtone existe en France et se manifeste communément dans les communautés d'enfants, crèches, écoles. Il existe de nombreux porteurs asymptomatiques. Les terrains favorables facilitent l'éclosion de la giardiose-maladie par pullulation du parasite.

D. Pathogénie

Les causes favorisantes peuvent être une hypochlorhydrie, un état de carence, par exemple : déficit en Ig A sécrétoires, immunodépression, etc.
Les biopsies d'un grêle parasité montrent une atrophie villositaire plus ou moins accusée, avec présence du flagellé au contact des entérocytes, dans les cryptes, les glandes de Lieberkühn, et même parfois dans le chorion de la muqueuse. Toutefois, cette présence ne s'accompagne jamais d'abcédation ni de lésion viscérale à distance à l'égal de celles décrites au cours de l'amibose. L'envahissement des voies biliaires par voie rétrograde trans-oddienne semble exceptionnel.

II. Diagnostic biologique

A. Signes d'orientation

Le diagnostic de l'affection est demandé au laboratoire par le clinicien sur l'observation des symptômes de troubles chroniques du transit, de dyspepsie, d'amaigrissement, d'insuffisance digestive plus ou moins caractérisée portant notamment sur l'absorption des lipides, ou lors d'un épisode aigu durant plusieurs jours de diarrhée douloureuse et putride souvent accompagnée de stéatorrhée.

B. Diagnostic direct (parasitologique)

Le diagnostic de certitude est un diagnostic parasitologique direct. Il consiste à l'examen des selles du malade, souvent de couleur mastic. On y recherche les kystes, facilement détectés à l'examen direct au Lugol du fait de leur abondance relative en cas de giardiose-maladie.

Les selles diarrhéiques de transit accéléré fournissent parfois des formes végétatives mortes mais bien conservées morphologiquement. Les selles de convalescents et de porteurs asymptomatiques, pauvres en kystes du parasite, ne seront positives qu'après mise en œuvre d'une méthode de concentration des kystes selon deux techniques différentes, les mêmes que celles préconisées dans le diagnostic de laboratoire de l'amibose.
Toutefois il existe, dans cette parasitose également, des périodes négatives de plusieurs jours durant lesquelles les kystes font défaut ; il y a donc lieu de renouveler deux fois l'examen coprologique s'il a été négatif, à 2 jours d'intervalle, avant de conclure à une négativité vraisemblable. Des périodes négatives peuvent parfois dépasser 15 jours, diminuant donc l'efficacité du diagnostic coprologique. La réactivation est inopérante.
Si l'état du sujet justifie une fibroscopie digestive par voie haute, la biopsie anatomopathologique, l'aspiration et le brossage duodénaux peuvent mettre en évidence des trophozoïtes du parasite, soit à l'examen direct à frais à 37 °C, soit après fixation-coloration. *Giardia* ne se multiplie pas dans les milieux de culture convenant aux amibes ou aux autres flagellés intestinaux (*Trichomonas*, *Chilomastis*). Il existe des milieux spéciaux permettant la culture, ils ne sont pas utilisables pour le diagnostic biologique. Des techniques immunologiques peuvent être utilisées pour la détection de l'antigène *Giardia* dans les selles du sujet (technique Elisa).

C. Diagnostic indirect (sérologique)

Le diagnostic sérologique visant à déceler des anticorps anti-Giardia sériques est possible mais peu réalisé en clinique de routine.

Conclusion

Le diagnostic de giardiose-maladie une fois posé avec certitude doit être suivi d'un traitement étiologique aux nitro-5-imidazolés administrés sous forme de comprimés ingérables (métronidazole, tinidazole, secnidazole, ornidazole).
Métronidazole (Flagyl®) adulte : 1,5 g/jour pendant 7 jours, enfant : 10 mg/kg/jour ;
Ornidazole (Tibéral®) : 1,5 g : une prise ;
Secnidazole (Secnol®) : 1,5 g : une prise ;
Tinidazole (Fasigyne®) : 2 g : une prise.

Autres thérapeutiques :
Albendazole (Zentel®) 400 mg/jour pendant 5 jours et nitazoxanide (Alinia®) en ATU nominative, traitement de 3 jours.

Une seconde cure après 2 ou 3 semaines est généralement recommandée.
Des examens coprologiques seront répétés à partir du 10e jour de fin de cure pour contrôler l'efficacité de celle-ci.
Il n'y a pas d'immunité et les réinfestations sont toujours possibles en milieu d'endémie. La prophylaxie de l'affection consiste dans l'assainissement de l'environnement humain, le respect des règles d'hygiène alimentaire, manuelle et fécale, ainsi que dans le traitement des sujets réservoirs parasitaires malades et des porteurs asymptomatiques dans l'entourage des malades.

L'essentiel de la question

Biologie du parasite

Protozoaire flagellé : *Giardia intestinalis.*

Cycle direct : trophozoïte dans la lumière intestinale de l'homme, extériorisation fécale de kystes résistants dans le milieu extérieur.

Contamination orale par ingestion des kystes avec l'eau et les aliments.

Parasitose cosmopolite.

Manifestations cliniques chez les enfants : diarrhée, malabsorption, stéatorrhée, amaigrissement.

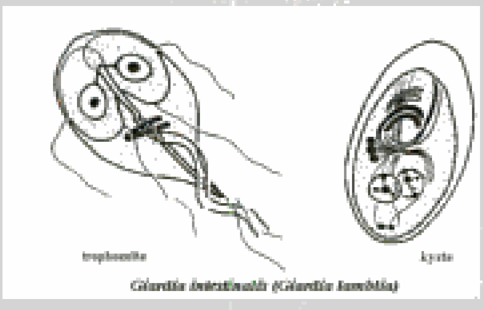
Diagnostic de la parasitose

Le diagnostic est essentiellement direct par mise en évidence des kystes dans les selles. L'élimination irrégulière des kystes impose la mise en œuvre de recherches sur une semaine en cas de diagnostic négatif.

Traitement et prophylaxie

La guérison est obtenue par administration orale de nitro-5-imidazolés chef de file : métronidazole (Flagyl®) pendant 7 jours ou tinidazole (Fasigyne®) : une dose.

La prophylaxie repose sur l'hygiène fécale, l'hygiène alimentaire et l'hygiène manuelle.



Schémas réalisés par le Pr. Deblock

Figure 1. Morphologie de *Giardia intestinalis*

Pour en savoir plus

- AFECT. « Dérivés nitrés de l'imidazole » in *Traité de chimie thérapeutique*, vol V. t II. Technique et documentation. Paris 2000 : 311-32.
- Magne D., Chochillon C., Savel J., Gobert J.-G. « Flagelloses intestinales. » Encyclopédie médicale et chirurgicale. Maladies infectieuses. Elsevier Paris 1996 : 8-515-A-10.
- Nozais J.-P., Datry A., Danis M. *Traité de parasitologie médicale*. Pradel, Paris 1996 : 281-3.
- Wéry M. *Protozoologie médicale*. Agence francophone pour l'enseignement et la recherche et De Boeck Université, Pradel, Paris 1995.

Épidémiologie et principe du diagnostic biologique du paludisme

S. DEBLOCK, T. DURIEZ
Laboratoire de parasitologie, UFR de pharmacie, Lille.

Le paludisme est une maladie parasitaire provoquée par la multiplication chez l'homme d'un protozoaire du sang et des tissus nommé plasmodium, transmis par l'intermédiaire des piqûres de moustiques du genre Anophèles. La maladie est répartie dans tous les pays tropicaux, elle y est très répandue ; elle existe également dans les pays méditerranéens.
Cliniquement, la maladie se manifeste sous la forme d'accès fébriles ; toutefois, une forme grave engendre un coma, rapidement mortel en l'absence de thérapeutique spécifique instaurée d'urgence. Du fait d'une grande mobilité des individus facilitée par la vulgarisation des transports en commun aériens, le paludisme peut s'observer en France chez les malades de tout âge ayant transité ou séjourné en pays d'endémie.
Le diagnostic de l'affection est avant tout un diagnostic direct, très facile à mettre en œuvre ; il met en évidence le parasite, fixé et coloré, dans le sang des malades. La sérologie est une méthode d'appoint, utile dans certains cas particuliers, à pratiquer en seconde intention.
La thérapeutique du paludisme, très simplifiée avec l'avènement de la chloroquine, est devenue plus complexe depuis l'apparition sur tous les continents de souches de Plasmodium falciparum résistantes à ce médicament. On estime à environ 5 000 le nombre de cas de paludisme annuellement détectés en France. Il s'agit, 9 fois sur 10, de sujets en provenance d'Afrique, parmi lesquels les Européens prédominent. 80 % des cas sont dus à Plasmodium falciparum.

I. Épidémiologie

A. Nature de l'agent pathogène du paludisme – Nomenclature

L'agent du paludisme humain est constitué d'un groupe de plusieurs espèces voisines de protozoaires du sous-embranchement des *Apicomplexa* (sporozoaires), parasites obligatoires des cellules. Classe des Coccidies, ordre des Hémosporidies (parasites de cellules sanguines), genre *Plasmodium*. L'homme peut héberger quatre espèces différentes dont la morphologie, la biologie et le rôle pathogène, bien que comparables, ne sont pas exactement superposables. Les quatre espèces sont *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* (cette dernière espèce est la moins répandue, on la trouve surtout en Afrique ; elle ressemble à *Plasmodium vivax*).

B. Biologie du parasite

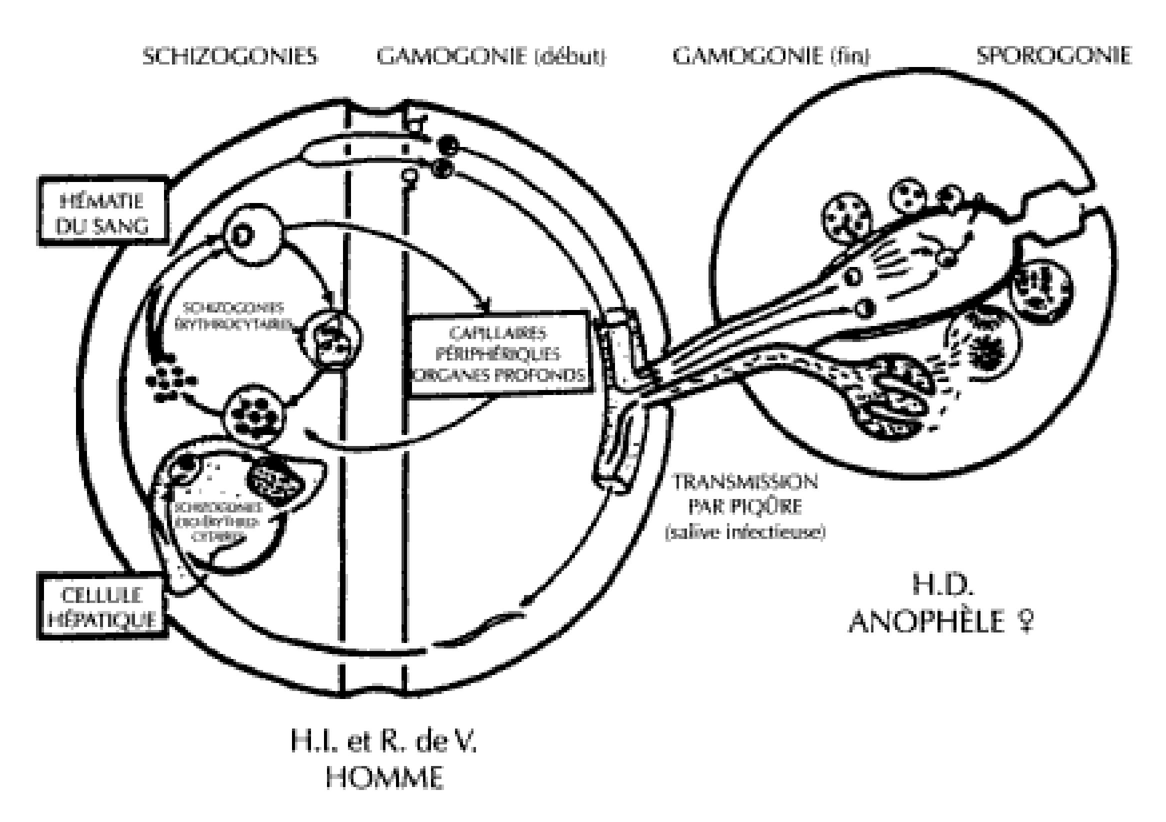
La biologie d'un parasite tient sous sa dépendance l'épidémiologie, la pathologie, la clinique et le diagnostic de la maladie que détermine ce parasite. Il convient donc de la préciser.
Les plasmodiums sont des parasites bihétéroxènes obligatoires qui évoluent alternativement chez deux hôtes spécifiques :
- le premier hôte est l'hôte définitif. C'est un insecte moustique de la famille des Culicidés appartenant au genre *Anopheles*, à l'exclusion de tous les autres de la famille (*Aedes*, *Culex*, *Mansonia*, etc.). Il assure la reproduction sexuée du parasite ;

- le second hôte est l'hôte intermédiaire. Il est constitué uniquement par l'homme. Ce dernier assure la reproduction asexuée du parasite ainsi que la phase initiale de la reproduction sexuée.

À chacune des phases de son évolution, le parasite se montre d'un polymorphisme élevé dont tous les stades ne peuvent être décrits dans le détail. Certains seront évoqués au chapitre du diagnostic biologique de la maladie.

C. Cycle évolutif

L'anophèle femelle infesté inocule dans le sang capillaire de l'homme, par piqûre, les sporozoïtes du parasite contenus dans la salive de l'insecte. Chez l'homme, le parasite entreprend une double série de multiplications par voie asexuée ou schizogonies.



H.D. : hôte définitif. **R. de V. :** réservoir de « virus ». **H.I. :** hôte intermédiaire.
Remarques : par assimilation avec d'autres maladies parasitaires impliquant des arthropodes dans le cycle biologique, l'Homme est couramment considéré, médicalement parlant, comme l'hôte définitif des plasmodiums, et l'anophèle comme l'hôte intermédiaire. C'est l'inverse du point de vue zoologique, adopté dans le texte.

Figure 1. Cycle évolutif des sporozoaires du paludisme

a) Schizogonies exo-érythrocytaires

Véhiculés par le sang, les sporozoïtes inoculés pénètrent immédiatement dans un hépatocyte et chacun se transforme successivement en trophozoïte puis en schizozoïte dont les produits de division, ou mérozoïtes, s'échappent de la cellule pour pénétrer aussitôt dans une hématie circulante. Le schizozoïte de ce cycle est une cellule parasitaire volumineuse (parfois appelée cryptozoïte ou corps bleu) qui libère à maturité entre 10 000 et 15 000 mérozoïtes, après 6 à 20 jours d'évolution selon l'espèce. Chez *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale*, un certain contingent

de trophozoïtes demeurent quiescents dans les hépatocytes pendant plusieurs mois, voire plusieurs années. On les nomme des hypnozoïtes. Leur réveil induit les rechutes à long terme de la maladie (au bout de 2 ans, voire au bout de 4 ou 5 ans). Ils n'existent ni chez *Plasmodium falciparum*, ni chez *Plasmodium malariae*.

b) Schizogonies érythrocytaires

Des stades évolutifs analogues aux précédents (trophozoïtes, schizozoïtes, mérozoïtes), mais de taille plus réduite, se renouvellent dans l'hématie circulante. Celle-ci libère dans le plasma, par destruction en fin de chaque schizogonie, entre 9 et 32 mérozoïtes selon l'espèce plasmodiale, toutes les 48 ou 72 heures.
Les schizogonies érythrocytaires se renouvellent successivement plusieurs fois à ce rythme pendant 21 jours environ, lors d'une première atteinte. Au-delà d'un certain seuil d'hématies parasitées dans le sang, les signes cliniques de la maladie se manifestent sous forme de crises fébriles.
Après une ou plusieurs schizogonies érythrocytaires, certains trophozoïtes n'évoluent pas en schizozoïtes mais mûrissent en gamétocytes des deux sexes. La maturation des gamétocytes dure entre 4 et 12 jours chez *Plasmodium falciparum*. À maturité, le gamétocyte remplit l'hématie, et son noyau est volumineux et unique. L'aspect du noyau et la coloration du cytoplasme permettent de distinguer les gamétocytes mâles des gamétocytes femelles. Leur survie dans le sang humain est courte. Ils survivront plus longtemps dans l'estomac de l'anophèle femelle réceptif ayant avalé le sang de l'homme porteur.

c) Gamogonie et sporogonie

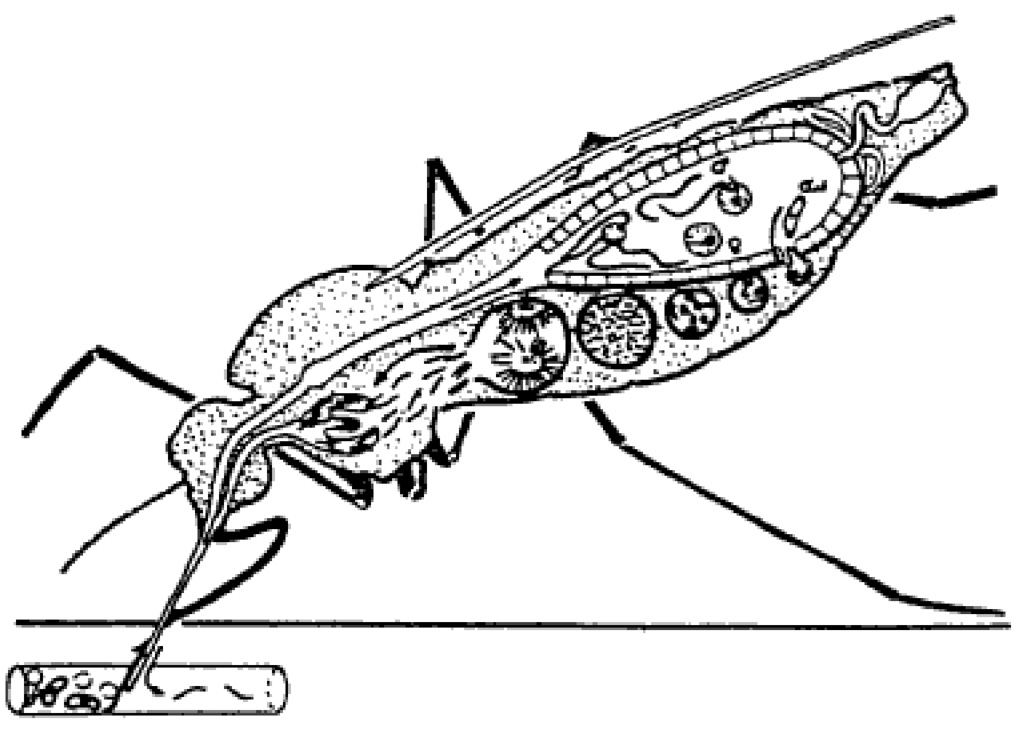
L'étape sexuée du cycle du parasite ou gamogonie s'achève dans le tube digestif du moustique infesté. La maturation des gamétocytes conduit à la formation des gamètes, et la fécondation a lieu dans l'estomac. L'œuf mobile (ookinète) se fixe du côté externe de la paroi de l'estomac en 24 heures. Puis il grossit considérablement, s'enkyste (ookyste) et entreprend sa maturation ou sporogonie. Il engendre de nombreux sporoblastes, sources d'une multitude de sporozoïtes mobiles qui se libèrent de l'ookyste mûr. Seuls survivront chez le moustique les sporozoïtes ayant réussi à migrer jusque dans les glandes salivaires en position thoracique.
La durée de l'évolution chez l'anophèle se situe entre 10 et 30 jours et elle est tributaire de divers facteurs : espèce de *Plasmodium*, température extérieure et espèce de l'hôte.
Le cycle asexué pourra recommencer dès l'inoculation des sporozoïtes infestants chez un hôte neuf.

D. Caractères épidémiologiques

La biologie du parasite présente plusieurs points de grandes conséquences épidémiologiques.

1. Influence de la nature des hôtes du cycle

La spécifité des deux hôtes du cycle est stricte.



Maturation des gamétocytes et fécondation dans l'intestin moyen (ou « estomac »). Migration de l'ookinète. Maturation (sporogonie) de l'œuf, à l'extérieur de l'estomac : formation des sporoblastes puis des sporozoïtes à l'intérieur des sporokystes. Migration des sporozoïtes vers les glandes salivaires thoraciques.

Figure 2. Gamogonie et sporogonie chez l'anophèle

a) Les plasmodiums du paludisme humain n'évoluent que chez l'homme

Le réservoir parasitaire est donc limité à l'*homme* (le cas du singe est tout à fait accessoire) porteur de gamétocytes mûrs dans le sang circulant, c'est-à-dire le malade, le convalescent et le porteur asymptomatique en état de prémunition parasitaire (« pseudo-immunité » acquise limitant les effets pathogènes des réinfestations successives naturelles). L'espèce humaine ne présente aucune immunité spontanée au paludisme qui soit liée à l'origine, à l'âge ou au sexe.

Il existe cependant des circonstances qui confèrent une certaine protection aux humains contre les effets cliniques du paludisme :

- les sujets ne présentant pas l'antigène Duffy sur leurs hématies sont naturellement résistants à l'infection par *Plasmodium vivax*. Ce cas est fréquent en Afrique noire et explique la rareté de cette espèce en Afrique intertropicale, cependant ces sujets pourront être infectés par *Plasmodium ovale* ;
- la présence d'hémoglobines anormales n'empêche pas l'impaludation, mais diminue la virulence. Exemple : HbF (hémoglobine fœtale) ;
- le déficit en G6PD, la malnutrition et un régime exclusivement lacté semblent limiter les effets du paludisme.

Enfin, la réponse immunitaire provoquée par des réinfestations successives (prémunition) limite les effets cliniques du paludisme, mais cette protection partielle disparaît avec les infestations. Il n'y a pas d'immunité durable en l'absence de réinfestation. Les sujets les plus exposés sont constitués par tous les nouveaux venus en pays d'endémie palustre : les nouveau-nés et les jeunes enfants autochtones d'une part, et les immigrants permanents ou temporaires (travailleurs, touristes…) d'autre part, tous non prémunis.

b) Les plasmodiums humains évoluent chez des *moustiques Culicidés du genre Anophèles* exclusivement

La biologie et l'éthologie de ces arthropodes gouvernent les modalités de la transmission de l'affection dans les pays soumis à l'endémie.

- L'anophèle est un moustique de mœurs nocturnes, distribué partout dans le monde ;
- La femelle seule est piqueuse et hématophage ; les repas sanguins renouvelés tous les 2 ou 5 jours sont indispensables à la maturation des ovules. Une femelle assure 3 à 5 pontes. Les mâles sont floricoles ;
- Toutes les espèces d'anophèles des pays d'endémie n'ont pas la même valeur épidémiologique. Les plus efficaces dans la transmission du paludisme sont les espèces anthropophiles et endophiles, c'est-à-dire celles qui pénètrent volontiers dans les habitations à la recherche d'humains piquables (par exemple, *Anopheles gambiae*, *funestus*, *maculipennis*, *nili*, etc.). Ces espèces favorables sont rurales ou urbaines. Les espèces sauvages et zoophiles ne jouent aucun rôle notable dans la transmission ;
- Les larves des anophèles sont aquatiques, et les femelles gravides recherchent des plans d'eau douce, libres et stagnants pour déposer leurs pontes en surface. Selon les espèces, de tels plans d'eau sont disponibles partout (étangs, mares, dépotoirs, ornières des chemins, pétioles engainants, etc.) surtout à la saison des pluies.

2. Influence de l'environnement naturel sur la transmission de la parasitose

Le parasite se développant chez un arthropode au cours d'une partie de son cycle, ce facteur joue un rôle capital sur la modulation de la transmission du parasite. Elle devient tributaire de plusieurs facteurs abiotiques de l'environnement qui règnent dans les pays d'endémie, et d'ordre essentiellement climatique.
En conséquence, la transmission du paludisme dépend de la présence d'eaux de surface et de la température extérieure.

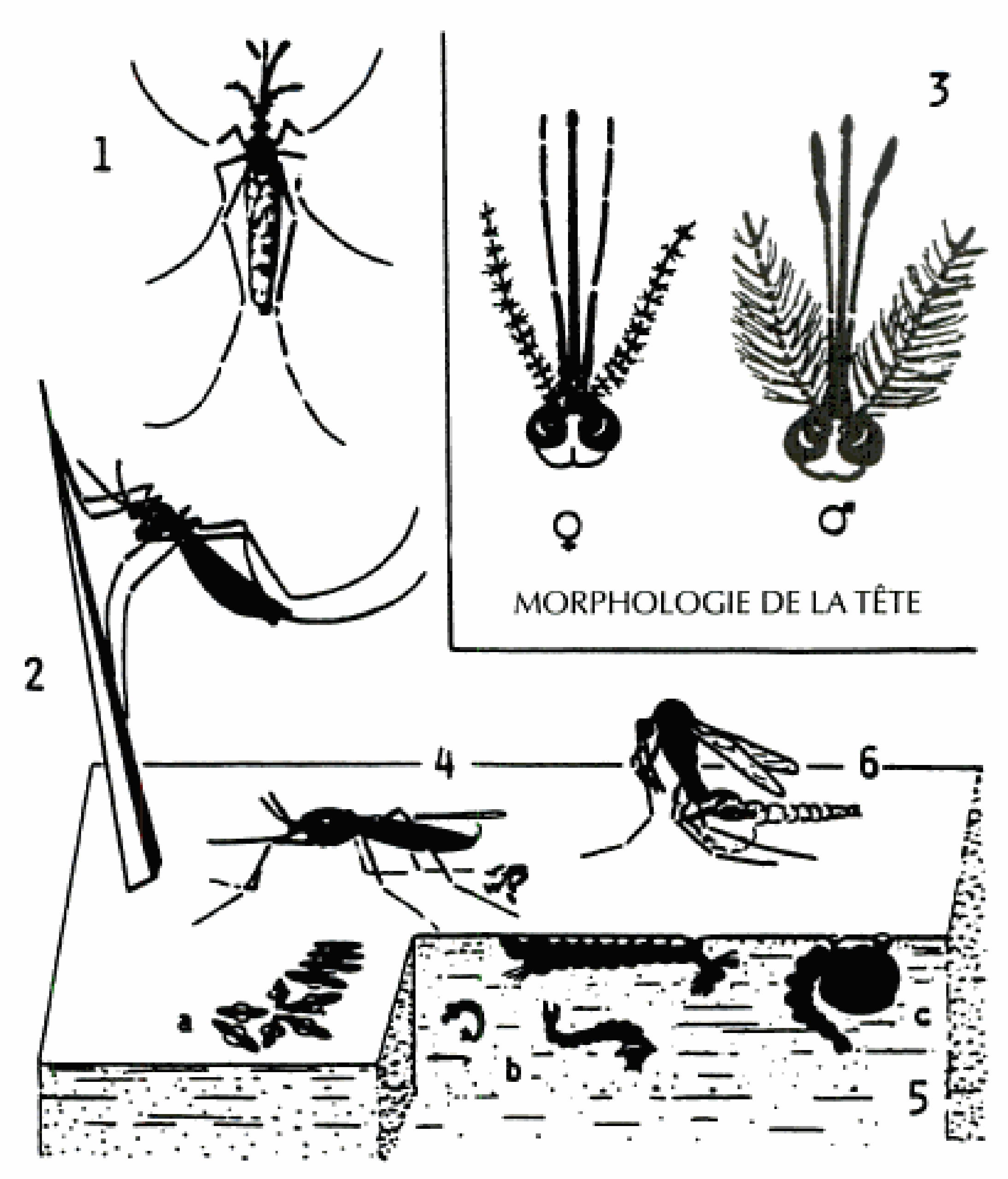
a) Les eaux de surface

En saison sèche, les eaux de surface des pays tropicaux s'évaporent et les moustiques disparaissent. La transmission est suspendue momentanément pour reprendre peu après les premières pluies qui réactivent les femelles en diapause imaginale. En pays équatoriaux, humides toute l'année, la transmission est ininterrompue.

b) *La température extérieure*

Le parasite est soumis chez l'arthropode aux fluctuations de la température ambiante. Or, la sporogonie offre des exigences thermiques minimales pour son déroulement : elle ralentit ou s'arrête aux températures trop basses, et reprend avec le retour de conditions de température plus élevée. Les exigences thermiques du parasite sont les suivantes :

- 16 °C continus pendant 4 semaines pour *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* ;
- 17 °C continus pendant 4 semaines pour *Plasmodium malariae*, espèce « lente » ;
- 21 °C continus pendant 2 à 3 semaines pour *Plasmodium falciparum* espèce « frileuse ».



1. Aspect de l'imago femelle (vue dorsale). 2. Imago posé sur un support (position oblique du corps). 3. Dimorphisme sexuel des antennes. Paire des palpes sensoriels de longueur égale à la trompe impaire. 4. Acte de ponte d'une femelle ; (a) Ponte flottant sur l'eau ; 5. (b) Stades larvaires dépourvus de siphon respiratoire ; (c) stade nymphal. Tous ces stades sont aquatiques mais à respiration aérienne. 6. Éclosion d'un imago en surface du plan d'eau.

Figure 3. Morphologie et biologie des anophèles

En conséquence, en pays tempérés, l'hiver suspend la transmission ; elle reprendra en fin de printemps et en été (paludisme saisonnier).
En pays équatoriaux, la transmission est permanente.
En pays tropicaux, le rythme des précipitations est prépondérant par rapport aux températures. Il s'ensuit que la maladie évolue généralement sur le mode endémique dans tous les pays intertropicaux, sur le mode épidémique saisonnier lié, soit à l'élévation de la température estivo-automnale en pays tempéré, soit à la saison des pluies en pays tropical.
La *répartition géographique* du paludisme découle de ces données. La maladie existe partout à la surface du globe à l'intérieur des isothermes nord et sud de 16 °C permettant la sporogonie chez l'anophèle de l'espèce la plus rustique (*Plasmodium vivax*). Toutefois, la maladie a pratiquement disparu en Amérique du Nord

et en Europe. Quelques chiffres résument l'importance relative de l'affection. Plus de 2 milliards d'hommes résident en pays d'endémie palustre, environ 200 millions sont atteints chaque année et plus de 2 millions de jeunes enfants meurent annuellement de la maladie, surtout en Afrique (d'après l'OMS).

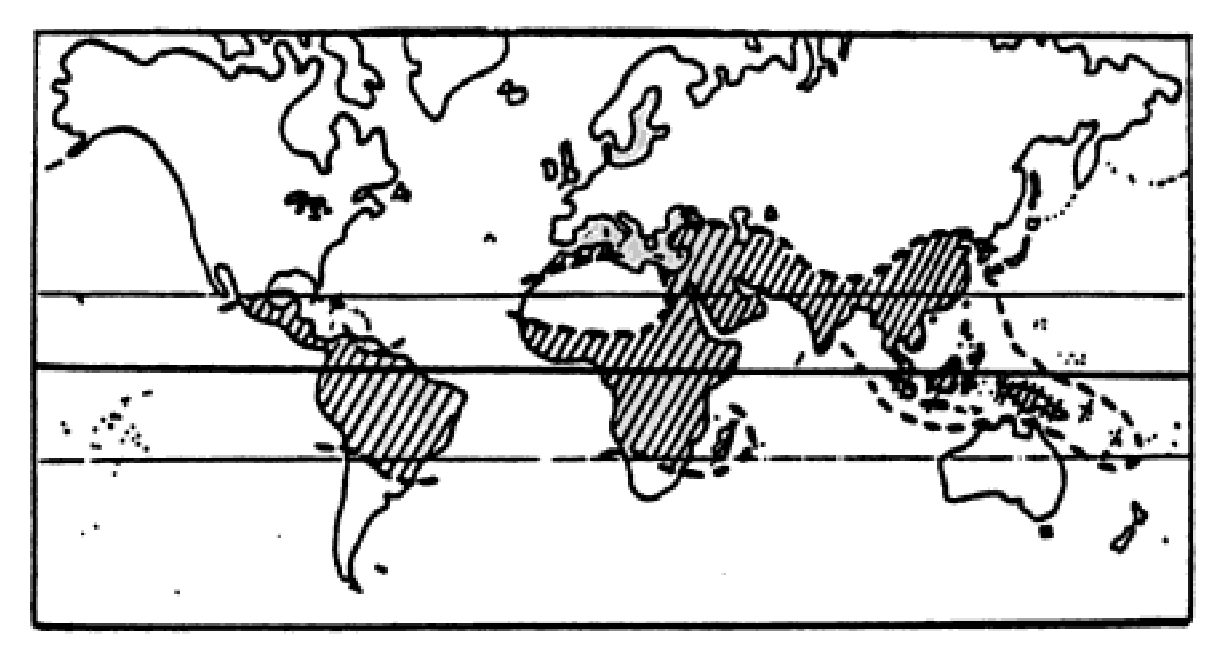


Figure 4. Répartition géographique du paludisme (hachures)

3. Indices épidémiologiques

L'endémie palustre dans une région est appréciée au moyen d'indices relatifs aux hôtes :

- pour les anophèles : indices sporozoïtiques et oocystiques (pourcentage d'anophèles femelles porteurs de ces formes) ;
- pour les humains : indices gamétocytiques (pourcentage de sujets porteurs de gamétocytes), indice plasmodique (pourcentage de sujets porteurs de formes endo-érythrocytaires), indice sérologique (pourcentage d'individus porteurs d'anticorps antipalustres, « sujets immuns ») et indice splénique. Ce dernier indice est basé sur la splénomégalie due au paludisme chronique (paludisme viscéral évolutif), c'est le pourcentage d'enfants de moins de 9 ans présentant une splénomégalie. Il faut noter qu'en région tropicale, le paludisme est la principale mais non la seule cause de splénomégalie infantile.

4. Types de paludisme en fonction du mode de contamination

Au mode de transmission naturel, le plus essentiel, s'ajoutent quelques modes accessoires ne jouant qu'un rôle faible dans l'épidémiologie de la parasitose mais qu'on ne peut ignorer en milieu hospitalier ; ce sont :

- le *paludisme congénital*, assez commun chez le nourrisson né de mère non prémunie, mais plus exceptionnel quand la mère est déjà prémunie ;
- le *paludisme transfusionnel* par le sang frais ou conservé, récolté à partir de donneurs asymptomatiques non contrôlés ou insuffisamment contrôlés (parasitémies indétectables). Les hématozoaires survivent à une température de conservation des sangs et des globules rouges de 4 °C pendant 4 semaines ;

- le *paludisme accidentel* transmis par une seringue se produit rarement chez les professionnels de santé, mais plus souvent chez les toxicomanes ;
- le *paludisme d'importation* est observé dans les pays tempérés chez des voyageurs venant du pays d'endémie, il est estimé à 5 000 cas annuels en France ; la mortalité est voisine de 1 %. Dans 90 % des cas, il s'agit de formes sans gravité immédiate. Ce paludisme est à distinguer du paludisme autochtone. Pour la France, seule la Guyane est une région d'endémie palustre reconnue (environ 2 000 cas annuels) ;
- le *paludisme des aéroports* ou paludisme d'importation des anophèles se produit lors d'étés chauds chez des personnes vivant à proximité des grands aéroports européens, et contaminées par des anophèles infestés voyageurs – quelques cas en France : 4 en région parisienne en 1999.

5. Pathogénie

L'action pathogène du parasite s'exerce en premier lieu au niveau des hématites, détruites précocement lors de chacun des cycles schizogoniques et en nombre croissant lors des crises.

Par ailleurs, l'hypersplénisme engendré simultanément conduit à une érythrophagocytose accrue soit des globules rouges parasités, soit des globules sains sensibilisés par des autoanticorps. Ce double mécanisme destructif engendre et entretient une anémie. Elle est initialement contemporaine des accès et proportionnelle à leur durée ; elle devient ultérieurement permanente lors du passage de l'affection à la chronicité dans les pays d'endémie.

La libération dans le sang de protéines diverses issues des corps parasitaires, de leur métabolisme et des globules rouges dégradés et détruits, entraîne l'apparition de réactions intenses de type anaphylactique, rythmées toutes les 48 ou 72 heures par la durée des schizogonies érythrocytaires. Elles se traduisent sous la forme de crises où se succèdent, en 10 heures environ, frissons, hyperthermie (40 °C) et transpiration profuse, suivis d'une rémission euphorisante.

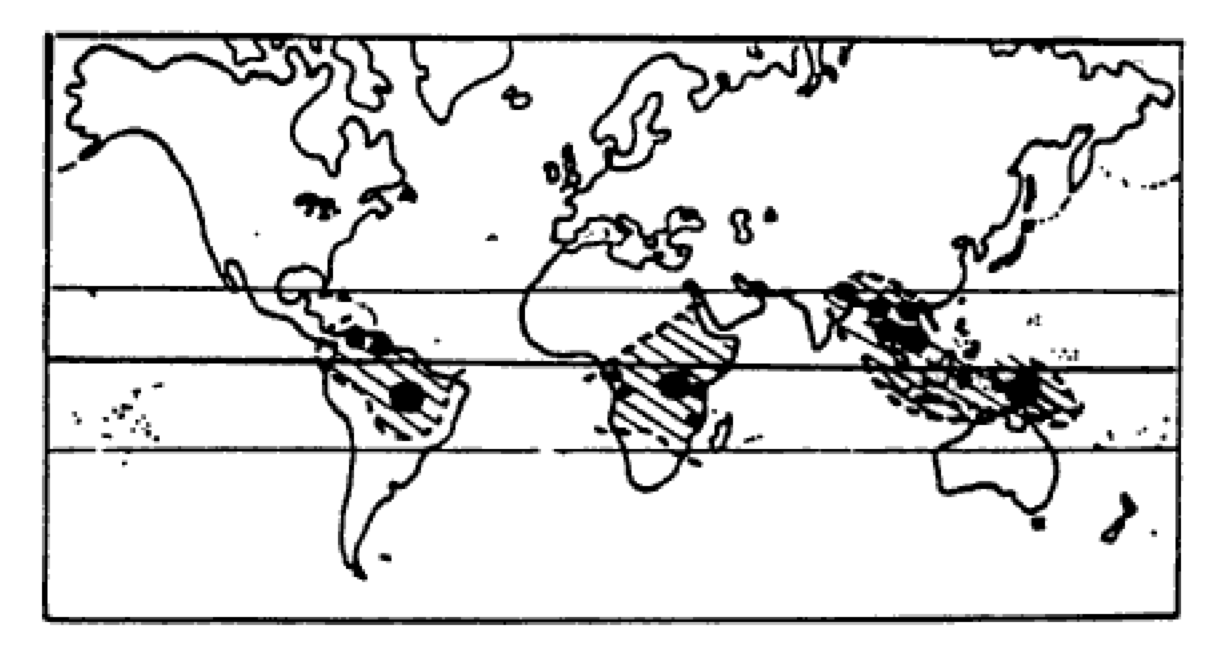


Figure 5. Zones de résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine (hachures)

Ces symptômes cliniques caractérisent les accès de fièvre dite tierce ou quarte en fonction de leur rythme d'apparition (fièvre tierce toutes les 48 heures pour *Plasmodium vivax, Plasmodium ovale* et *Plasmodium falciparum* ; fièvre quarte toutes les 72 heures pour *Plasmodium malariae*).
Les troubles viscéraux affectent essentiellement la rate, le foie, le cerveau et les reins. La splénomégalie est douloureuse, précoce, contemporaine des accès, et parfois considérable. L'hépatomégalie est toujours plus discrète ; elle ne dégénère jamais en cirrhose. Il peut exister, à la longue, une surcharge permanente des viscères en hémozoïne grisâtre, déchet de l'hémoglobine dégradée par les parasites globulaires, libérée lors de la libération des mérozoïtes.
Plasmodium falciparum, dont les schizozoïtes s'accumulent électivement dans les capillaires des organes profonds, est à l'origine de troubles de la circulation cérébrale sanguine, générateurs de céphalées intenses dans les cas bénins et du paludisme pernicieux, parfois mortel dans les cas graves non traités en temps utile.
L'infection chronique à *Plasmodium malariae* induit assez fréquemment des néphroses qu'on attribue à la formation d'immuns complexes circulants qui altèrent l'intégrité fonctionnelle des capillaires des corpuscules de Malpighi : néphropathie quartane.
Les troubles viscéraux qui peuvent être observés au cours du paludisme de primo-infection guérissent généralement sans séquelle. Mais en pays d'endémie où le sujet est soumis à des réinfestations multiples et répétées, ces troubles viscéraux ont tendance à s'aggraver et contribueront au tableau clinique dit « paludisme viscéral évolutif » : anémie, dyspnée, œdème, splénomégalie, fièvre et retard staturo-pondéral chez les enfants.
La fièvre bilieuse hémoglobinurique est un syndrome hémolytique suraigu déclenché après un refroidissement survenant chez un sujet parasité par *Plasmodium falciparum* depuis longtemps et dont la prophylaxie était assurée par des prises irrégulières de quinine. Cette complication, devenue rare depuis la généralisation de la prise prophylactique des antimalariques de synthèse, semble en recrudescence dans les régions de chimiorésistance.

II. Diagnostic biologique du paludisme

A. Signes d'orientation

Clinique

En pays d'endémie, le diagnostic de paludisme est évoqué *a priori* en présence d'un état fébrile. En fait, les formes cliniques de la maladie parasitaire sont multiples.
On distingue classiquement :

- les accès de primo-invasion qui se déclenchent après quelques semaines d'incubation suivant la piqûre infestante. Ces accès peuvent être suivis ou non de diverses complications possibles, selon les circonstances ;
- une complication souvent assez précoce : le paludisme pernicieux, dont le neuropaludisme est une expression ; le terme paludisme grave est à préférer

(XIIe Conférence de consensus sur le paludisme d'importation). Des critères de gravité sont définis par l'OMS en région d'endémie (coma, anémie profonde (Hb < 5 g/dL), insuffisance respiratoire, hyperglycémie, état de choc, acidose, etc.) ;
- une complication plus tardive, consécutive aux réinfestations permanentes en pays d'endémie : paludisme viscéral évolutif (dit aussi « chronique »).

Le tableau clinique des fièvres tierces ou quartes avec leur triade symptomatique classique (frisson, chaleur, sueur) n'est pas nécessairement respecté. Les formes possibles sont nombreuses : troubles digestifs, état pseudogrippal, fièvre continue, convulsions, ictère, pseudo-méningite, paludisme larvé des sujets sous prophylaxie à la chloroquine et infestés par un *Plasmodium falciparum* partiellement résistant... Mention particulière doit être faite de l'accès pernicieux avec signes neurologiques, obnubilation, confusion, coma hyperthermique, dont l'évolution naturelle est la mort dans un délai de 2 ou 3 jours. L'accès pernicieux chez l'enfant peut se traduire par des convulsions, de l'hypoglycémie et une anémie importante.

Le laboratoire a un rôle capital à jouer dans le diagnostic de l'affection car un syndrome fébrile chez un voyageur de retour en Europe peut avoir de multiples étiologies.

Dans tous les cas de paludisme déclaré en Europe, l'anamnèse doit faire état d'un séjour antérieur du malade en pays d'endémie. Toutefois, les accès de reviviscence, ou rechutes à long terme, surviennent parfois longtemps après la primo-invasion (2, 4, 6 ans selon l'espèce de *Plasmodium* en cause, mais rarement davantage). La cause déclenchante est souvent un état momentané d'affaiblissement de la résistance physiologique du sujet qui réactive, soit les hypnozoïtes hépatiques de *Plasmodium vivax* ou *Plasmodium ovale*, soit quelques trophozoïtes érythrocytaires de *Plasmodium malariae* quiescents dans les capillaires des organes profonds. Un accouchement par exemple constitue une cause possible de réactivation.

Quelle que soit la forme clinique observée, la mise en évidence du parasite dans les globules rouges permet de porter sans ambiguïté le diagnostic étiologique de l'affection. Les autres examens sont secondaires. Mention spéciale sera néanmoins faite de la sérologie qui a ses indications, mais en seconde intention.

B. Examens de laboratoire non spécifiques

1. Numération – Formule sanguine

Cet examen n'est jamais significatif.

L'anémie, contemporaine des accès fébriles, se situe aux environs de 3 ou 4 millions de GR/mm^3 (3 ou 4 T/L) selon le degré de gravité et de durée. L'anémie rétrocède en 3 semaines environ lors des rémissions. L'anémie est parfois plus nette lors des accès de reviviscence et lors du paludisme viscéral évolutif, rarement observé en France. Elle est souvent absente lors des accès pernicieux à *Plasmodium falciparum*. Elle serait très élevée au cours de la crise hémolytique de la fièvre bilieuse hémoglobinurique.

Les hématies montrent plusieurs anomalies morphologiques liées à l'anémie (anisocytose, poïkilocytose, polychromatophilie, anneaux de Cabot, granulations basophiles...).

La formule sanguine n'est jamais significative. Une hyperleucocytose est possible au début de l'infection ; elle peut être suivie par une lymphopénie. La thrombopénie (< 150 G/L) est fréquente chez *Plasmodium falciparum*.
La numération leucocytaire, subnormale, va à l'encontre d'une étiologie infectieuse de l'état fébrile élevé, continu ou récurrent du malade.
Le taux d'éosinophiles sanguins est normal, l'existence d'une hyperéosinophilie doit orienter le diagnostic vers une helminthiase.
Cependant, l'augmentation de la CRP et la chute de l'haptoglobine semblent fréquentes lors du paludisme.

2. Analyse du LCR

Au cours de comas palustres, la ponction du LCR ramène un liquide normal, ce qui permet d'exclure les étiologies infectieuses du symptôme. Il ne contient pas de parasite. Une ponction médullaire peut contenir de rares trophozoïtes. Un examen sanguin s'avère alors indispensable.

C. Diagnostic direct

Le principe du diagnostic biologique du paludisme consiste dans la mise en évidence des hématozoaires dans le sang circulant après la fixation et la coloration qui les différencient correctement de la cellule hôte. Le diagnostic biologique du paludisme est une urgence, les résultats doivent être rendus dans un délai de 2 heures, directement au clinicien (XII[e] Conférence de consensus sur le paludisme d'importation).

1. Le prélèvement et son traitement

- On pratique une ponction capillaire :
  - pendant l'accès fébrile (une heure avant son acmé de préférence, moment de la parasitémie maximale en schizozoïtes mûrs) ;
  - en l'absence de toute chimiothérapie spécifique (du type quinine, chloroquine ou antimétabolites).
- On confectionne extemporanément au chevet du malade plusieurs lames de « gouttes épaisses », de frottis minces et de frottis épais très rapidement séchés par agitation à l'air immédiatement après leur confection.

La goutte épaisse est colorée selon sa technique propre (classique, ou selon le protocole d'Errecart, 1945, qui améliore la fixation, respectant beaucoup mieux la morphologie des parasites). La GE permet la découverte de parasites rares concentrés sur une petite surface par l'empilement des GR, rendus transparents par la deshémoglobinisation préalable à la fixation et à la coloration. Les hématozoaires sont concentrés mais leur identification est difficile.
Le frottis, coloré au May-Grünwald-Giemsa selon la technique classique de Romanovsky, permet la découverte de parasites bien étalés et lisibles, facilitant le diagnostic d'espèce – indispensable – et la détection d'un parasitisme mixte éventuel. Le Giemsa seul est plus rapide ; la coloration par le RAL 555 est un bon compromis.
Remarque : il est possible d'opérer également à partir de sang obtenu par ponction veineuse recueillie sur anticoagulant (citrate, EDTA).

Lecture

Les étalements colorés sont lus au microscope au grossissement de l'immersion suffisamment longtemps (5 ou 10 minutes pour une goutte épaisse et 15 ou 20 minutes pour un frottis).

Le diagnostic d'espèce est indispensable (de manière à apprécier les suites éventuelles d'une crise palustre), de même qu'une évaluation de la densité parasitaire, calculée par rapport à un nombre de leucocytes lus sur le frottis.

Ce qu'il faut savoir

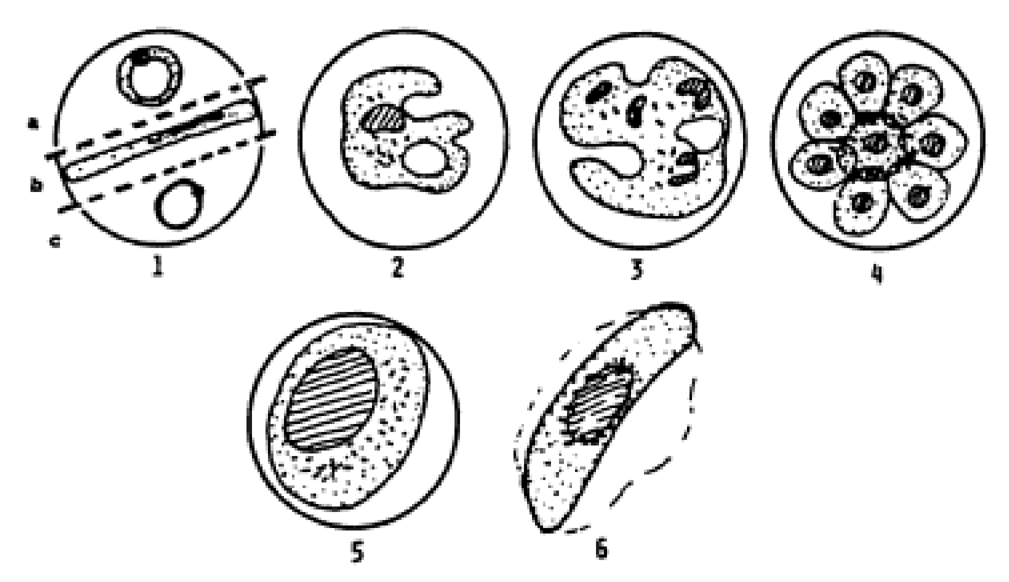
Dans tous les cas, le parasite est endoglobulaire.

L'hématie parasitée est d'un diamètre supérieur, égal ou inférieur à la normale selon le *plasmodium* en cause ou l'âge des schizozoïtes. Fragilisée par *Plasmodium ovale*, l'hématie s'allonge ou se frange dans le sens du frottis.

Le pourcentage des GR parasités varie selon le moment du prélèvement et de la phase de la maladie.

Dans les meilleures conditions, ce pourcentage se situe entre 1 et 2 % avec *Plasmodium malariae* ; entre 1 et 4 % avec *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* ; entre 1 et 5 %, voire 10 % dans les formes bénignes à *Plasmodium falciparum* et entre 30 et 40 % dans les formes malignes.

Au May-Grünwald-Giemsa, les cytoplasmes sont bleu ciel, le ou les noyaux rouge vif, et le pigment noir. L'hématie est rose brique. Les thrombocytes sont rougeâtres. L'observation de leucocytes dans la préparation permet de juger de la qualité de la coloration.



Hématie en blanc. Parasites avec cytoplasme (bleu) en pointillé. Noyaux (rouge) en hachuré. Pigment (noir) bacilliforme.

I. Trophozoïtes :

1. jeunes (corps en châton) : annulaire épais chez *P. vivax et P. ovale (a), en barre ou en drapeau chez P. malariae (b), annulaire fin et polyparasitisme possible chez P. falciparum (c).* **2.** âgé. Corps amoeboïde. Noyau unique.

II. Schizozoïtes :

3. jeunes. **4.** âgés, avec mérozoïtes constitués. (Corps en rosace ou en marguerite chez *P. malariae* du fait de sa régularité).

III. Gamétocytes :

5. à corps massif *(P. vivax, ovale, malariae).* **6.** à corps allongé en banane ou en croissant chez *P. falciparum.* Fantôme globulaire à peine apparent.

Figure 6. Morphologie des plasmodiums du cycle schizogonique érythrocytaire sur frottis sanguins. Aspect schématique

• Morphologie générale des parasites

Les parasites emplissent tout ou partie de l'hématie parasitée dont il ne demeure plus que le stroma globulaire en fin de cycle schizogonique.

- *Trophozoïte jeune.* De diamètre restreint. Cytoplasme annulaire autour d'une vacuole rose pâle. Noyau excentré, unique, situé dans l'anneau (image du corps en chaton) ; le cytoplasme de *Plasmodium malariae* peut être allongé en bande transversale.
- *Trophozoïte âgé.* Plus volumineux et plus polymorphe du fait de son amœboïsme. Parfois quadrangulaire.
- *Schizozoïte.* Volumineux. Plus d'un noyau : entre 6 et 20 selon le nombre de mérozoïtes de l'espèce.
- *Mérozoïtes* : encore agglutinés dans l'hématie juste avant leur libération, ils forment les corps en rosace ou en marguerite bien dessinés chez *Plasmodium malariae*, mais plus en paquet chez *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale*. Schizozoïtes et mérozoïtes sont absents chez *Plasmodium falciparum* puisque ce stade de la schizogonie se déroule dans les capillaires viscéraux et cérébraux. La découverte de schizozoïtes de *Plasmodium falciparum* dans le sang périphérique doit faire craindre un paludisme pernicieux.
- *Gamétocytes.* Se différencient parfois difficilement des trophozoïtes âgés par leur gros noyau unique mauve (mâle) ou rosé (femelle). Ne sont très caractéristiques, et assez abondants, que les gamétocytes de *Plasmodium falciparum* (corps en banane ou en croissant) qui suffisent pour poser le diagnostic d'espèce.

• Structure de l'hématie parasitée

La paroi globulaire altérée constitue le fin piqueté rouge vif régulièrement dispersé des « grains de Schüffner » de *Plasmodium vivax* et de *Plasmodium ovale*. Les bosses de surface engendrées par *Plasmodium falciparum* ne sont pas discernables, on les appelle « knobs », elles ont été incriminées dans le processus de cytoadhérence des hématies parasitées dans les veinules cérébrales. Le pigment noir ou hémozoïne, localisé dans le cytoplasme parasitaire, est particulièrement précoce et abondant chez *Plasmodium malariae*.

Les autres caractéristiques des espèces de *Plasmodium* sont résumées dans le *tableau 1*.

• Causes d'erreurs éventuelles

- Par excès (à la lecture des frottis) : corps de Jolly. Plaquette surmontant un GR ;
- Par défaut : parasitémie en-dessous du seuil de détection ; prélèvement sanguin pratiqué en dehors de la période favorable, ou après un apport thérapeutique spécifique.

Un examen parasitologique direct négatif n'exclut jamais définitivement une parasitose. Renouveler les prélèvements deux fois par jour pendant 2 ou 4 jours dans le cas du paludisme ; au-delà, il devient improbable.

Appliquer une méthode de concentration avant la confection des frottis. L'une d'elles utilise un haut polymère, le Ficoll. Le sang veineux prélevé est mélangé en tube à une solution de Ficoll et centrifugé. Les GR sains sédimentent plus vite que les GR parasités. On examinera, après son isolement, la couche de globules enrichie en GR parasités.

Tableau 1. Principales caractéristiques différentielles des espèces de *Plasmodium*

Espèces	P. vivax	P. ovale	P. falciparum	P. malariae
Clinique	Fièvre tierce bénigne	Fièvre tierce bénigne	Fièvre tierce maligne (parfois journalière)	Fièvre quarte
Longévité moyenne du parasite	3 ans (jusqu'à 5 ans)	3 ans	1 an	5 à 10 ans (ou plus)
Répartition géographique du parasite	Pays tempérés, pays tropicaux en altitude	Afrique intertropicale	Pays tropicaux (le plus fréquent)	Relativement rare, Afrique
Caractères morphologiques				
Aspect du frottis	Frottis bigarré	Frottis bigarré	Monotone, pluriparasitisme fréquent	Frottis bigarré
Taille des hématies	Hématies > normale	Hématies fragilisées, ovalisées	Hématies normales	Hématies < normale
Formes parasitaires	Toutes présentes	Toutes présentes	Trophozoïtes jeunes et gamétocytes	Toutes présentes
Pigment (hémozoïne)	Rare	Rare	Absent	Très abondant
Granulations cytoplasmiques de l'hématie	Schüffner	Schüffner (très précoces)	Généralement non observées dans le sang périphérique	Absentes
Trophozoïtes (aspect caractéristique)	Corps amœboïdes		Formes annulaires (à 2 noyaux)	En bande équatoriale
Schizozoïtes	Rosace irrégulière (12 à 18 mérozoïtes)	Rosace irrégulière (8 mérozoïtes)	Absents	Rosace régulière (8 mérozoïtes)
Gamétocyte	Occupe la totalité de l'hématie	Inférieur au volume de l'hématie	En banane	Occupe la totalité de l'hématie
Parasitémie	Faible	Faible	Parfois élevée	Très faible

Employer une méthode de marquage sélectif des GR parasités sur les étalements de sang des malades, ce qui accélère leur repérage au microscope. Elle est basée sur le principe de la technique d'immunofluorescence indirecte de Coons. Le sang étalé sur lame est incubé au contact d'un réactif constitué d'anticorps monoclonaux anti-*Plasmodium falciparum* ; ils se fixent électivement sur les parasites. Ce couplage est révélé par un immunoconjugé fluorescent (grâce à un marquage par un flurochrome tel que ITTCF) qui s'illumine en vert au microscope éclairé en lumière UV. La coloration est spécifique et sa sensibilité égale à celle de la goutte épaisse, mais elle est plus rapide à lire.
Réaliser une détection des *plasmodiums par* un autre mode ou un diagnostic indirect.

2. Autres modes de détection des plasmodiums

Ces techniques sont souvent plus qualitatives que quantitatives.

- Le *QBC Malaria Test* (*Quantitative Buffy Coat*) utilise la capacité de l'acridine orange à rendre fluorescents les noyaux et les éléments parasitaires du sang. L'examen est facilité par l'emploi de tubes capillaires qui, après centrifugation, réalisent une concentration des hématies parasitées en dessous de la couche des granulocytes ; ce caractère de densité est exploité dans une technique de concentration parasitaire citée ci-dessus. L'observation est faite au microscope à fluo-

rescence. Cette technique permet de détecter facilement des plasmodiums peu nombreux mais le diagnostic d'espèce est difficile. Ce test est très rapide, sensible (seuil de détection : 2 hématies parasitées par µl de sang) et facile à réaliser, mais il nécessite un appareillage onéreux ;

- La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ; elle détecte à l'aide de sondes nucléotidiques spécifiques l'ADN parasitaire amplifié. Très sensible, cette technique peut détecter un parasite dans l'échantillon sanguin, mais elle est longue, difficile et coûteuse à réaliser ;
- Tests immunochromatographiques pour la détection d'antigènes HRP II (*Histidine Rich Protein*) spécifiques de l'espèce *Plasmodium falciparum*. Ce test a été initialement présenté sous le nom de Parasight F. De nouvelles versions existent, en particulier Now ICT Malaria et CORE Malaria pan Pv/Pf qui incluent la détection de HRP II pour *Plasmodium falciparum* et la détection d'une LDH pour l'identification de *Plasmodium vivax*. Ces tests rapides, sensibles et spécifiques, ne nécessitent pas de matériel particulier mais ils peuvent déceler la présence d'antigènes parasitaires en l'absence de parasitémie détectable, en particulier pendant les jours qui suivent un traitement efficace. Ces tests peuvent être utilisés en urgence mais ne remplacent pas le frottis mince, qui sera généralement utilisé en confirmation ;
- La cytométrie de flux en continu est un nouveau moyen de détection des hématies parasitées après marquage de l'ADN parasitaire par le thiazol orange. C'est une technique très sensible, quantitative, spécifique, mais qui ne permet pas une différenciation des espèces.

3. Le diagnostic biologique indirect ou immunologique

Les plasmodiums sont antigéniques et suscitent la formation d'anticorps sériques spécifiques détectables au laboratoire au moyen de réactions appropriées. Les antigènes réactifs utilisés sont constitués :

- soit par des antigènes hétérologues de substitution tels que des *plasmodiums* de singe de laboratoire, comme *Plasmodium cynomolgi bastianelli*, antigéniquement proche de *Plasmodium vivax* ;
- soit par des antigènes homologues obtenus à partir de sang de malades très positifs (en pays d'endémie), ou mieux, à partir de l'entretien du cycle schizogonique érythrocytaire de *Plasmodium falciparum* sur GR humains (selon Trager et Jensen, 1976). Par exemple, Monofluo kit *Plasmodium falciparum* et Falciparum Spot IF.

À noter que chaque espèce de *Plasmodium* ne répond correctement que si elle est confrontée à son antigène homologue.

Résultats : les anticorps paludéens sont détectables dès la fin du premier mois d'infestation ; ils s'élèvent au cours des mois suivants et demeurent élevés puis s'abaissent lentement jusqu'à la fin de la première année pour persister à taux faible pendant plusieurs années (en absence de réinfestations qui modifient ce schéma simple). Par conséquent, hors des pays d'endémie et à l'écart des réinfestations, un traitement spécifique efficace négative lentement la sérologie, entre 6 et 12 mois. En zone d'endémie, la sérologie antipalustre est ininterprétable. En Europe, sa négativité permet d'exclure un diagnostic de paludisme.

Intérêt de la sérologie

Elle permet de dépister :

- les porteurs asymptomatiques tels que les donneurs de sang dans les centres de transfusion sanguine ;
- les malades dont les symptômes, comme la parasitémie, sont « décapités » par l'administration précoce d'antipaludiques, ou par l'installation d'un paludisme à *Plasmodium falciparum* sous chimioprophylaxie avec une souche partiellement chloroquinorésistante.

Elle permet d'apprécier, éventuellement, l'efficacité d'un traitement spécifique par l'abaissement des taux de dilution de sérum au cours du premier trimestre suivant la fin du traitement.

Elle est également utilisée lors d'études épidémiologiques en pays d'endémie.

4. Recherche de la chimiorésistance

On soupçonne la chimiorésistance d'une souche de *Plasmodium falciparum* infestant un malade face à l'échec d'une chimioprophylaxie ou d'une thérapeutique bien conduite. L'origine géographique de la souche peut apporter une confirmation de l'observation. La chimiosensibilité aux antimalariques du plasmodium en cause peut être appréciée *in vitro* au laboratoire, sur une culture d'hématozoaires. Toutefois, l'infrastructure matérielle indispensable à la réalisation technique du test réserve actuellement celui-ci à de très rares centres de recherche spécialisés. La chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* est surveillée par le Centre national de référence de la chimiosensibilité du paludisme (CNRCP) (hôpital Bichat, Paris).

Conclusion

Le diagnostic de paludisme a pour corollaire évident la mise en œuvre de la thérapeutique spécifique. Même si elle n'est que symptomatique, elle libère le malade des effets pénibles des accès palustres en stoppant les schizogonies érythrocytaires. En présence de signes de gravité, le traitement doit être instauré d'urgence et le patient hospitalisé. En France, plus de 4 000 cas de paludisme diagnostiqués annuellement sont dus à *Plasmodium falciparum* et les voyageurs proviennent en majorité d'Afrique, où les souches chimiorésistantes sont estimées entre 40 et 50 %.

Les principaux médicaments disponibles sont la chloroquine (Nivaquine®), la quinine (Quinimax® et Quinoforme®), la méfloquine (Lariam®) et l'halofantrine (Halfan®), auxquels s'ajoutent des antimétabolites anticoccidiens comme le Fansidar®, un antibiotique : la doxycycline (Vibramycine® et Doxypalu®), et les dérivés de l'artémisinine (Paluther®).

En cas de *paludisme sans signe de gravité*, une préférence sera donnée à la chloroquine. Si le sujet vient d'une zone à *Plasmodium falciparum* chimiorésistant, on utilisera la quinine (7 jours) ou la méfloquine (3 prises sur 24 heures). L'halofantrine (3 prises espacées de 6 heures) présente un risque de complication cardiaque chez l'adulte, mais sera souvent utilisée en pédiatrie.

Les multithérapies associant des molécules antimalariques de modes d'action différents et de demi-vies différentes sont utilisées dans les zones de forte résistance.

On citera Malarone® (atovaquone + proguanil) et LapDap® (chlorproguanil + dapsone). L'OMS préconise les ACT (associations comprenant un dérivé de l'artémisinine) tels que Coartem® (artéméther + luméfantrine).
En cas de *paludisme grave à Plasmodium falciparum*, la quinine (7 jours) instaurée d'urgence par voie intraveineuse est la seule possibilité. En cas de suspicion de souches à sensibilité diminuée à la quinine (Asie du Sud-Est, Amazonie), la doxycycline peut lui être associée. Une mesure de la quininémie peut être réalisée au 3e jour du traitement si l'état du patient ne s'améliore pas.
La gravité potentielle du paludisme entraîne la nécessité de conseils prophylactiques adaptés à l'état du sujet, et au voyage envisagé. Il faut rappeler qu'une prophylaxie bien conduite n'empêche pas l'impaludation et que la seule précaution efficace est d'éviter les piqûres d'anophèles.

L'essentiel de la question

Épidémiologie du paludisme

- Agents pathogènes : hématozoaires du genre Plasmodium (*Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae, Plasmodium falciparum*) ;
- Cycle évolutif ; hôte définitif : diverses espèces de moustiques du genre *Anophèles* ; hôte intermédiaire : l'espèce humaine ;
- Caractères épidémiologiques : nécessité d'une température supérieure à 16 °C pendant 3 ou 4 semaines et présence d'eau stagnante ;
- La contamination de l'homme se fait par la piqûre nocturne de l'anophèle. Les autres possibilités sont la transfusion, l'inoculation accidentelle, le passage transplacentaire ;
- Paludisme d'importation en France : environ 5 000 cas annuels (paludisme des aéroports rare).

Diagnostic biologique du paludisme

- Signes d'orientation :
  - séjour en pays d'endémie ou conditions de contamination,
  - signes cliniques du paludisme *sans signe de gravité* : classiquement fièvre tierce ou quarte (frisson, chaleur, sueur), 8 à 10 accès, parfois fièvre continue avec troubles digestifs,
  - Paludisme *avec signes de gravité* (coma, anémie, troubles respiratoires...) dû à *Plasmodium falciparum* : constitue une urgence diagnostique et thérapeutique. Paludisme viscéral évolutif (ou chronique) : lésions viscérales dues à des réinfestations successives (splénomégalie, anémie),
  - signes biologiques non spécifiques : anémie, thrombopénie, leucopénie.
- Diagnostic direct

Se fait après prélèvement de sang périphérique sur frottis mince ou goutte épaisse colorée.
Les parasites sont endo-érythrocytaires, (cytoplasme bleu, noyaux rouges, pigment noir). Les trophozoïtes sont généralement annulaires. Les schizozoïtes plus volumineux possèdent plusieurs noyaux et du pigment ; les gamétocytes sont volumineux avec un gros noyau unique.

En dehors de la découverte d'un élément de morphologie pathognomonique (gamétocytes de *Plasmodium falciparum*, corps amœboïde de *Plasmodium vivax*, bande équatoriale de *Plasmodium malariae*), l'identification de l'espèce plasmodiale ne peut que se faire sur un faisceau d'arguments concordants.
Le diagnostic d'espèce ainsi que le calcul de la parasitémie sont indispensables pour apprécier les risques de paludisme grave.
Les autres modes de détection des plasmodiums sont le *QBC Malaria Test*, les tests immunologiques de détection d'antigène HSR II pour *Plasmodium falciparum ;* LDH pour *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* et l'utilisation de la PCR.

• Diagnostic indirect

En région d'endémie, la recherche des anticorps antiplasmodium n'a qu'un intérêt épidémiologique. En métropole, les anticorps peuvent être recherchés en cas de faible parasitémie, de traitement préalable au diagnostic ou pour *screener* les donneurs de sang.
La recherche de la chimiosensibilité des souches peut être nécessaire en cas d'échec thérapeutique ou prophylactique documenté (CNRCP).

Traitement

- Paludisme sans signe de gravité : chloroquine ; en cas de chimiorésistance : quinine, méfloquine, halofantrine, doxycycline, ou antimétabolites coccidiens (Fansidar®) et associations.
- *Paludisme avec signes de gravité :* quinine par voie IV.
- *Cas particuliers de femmes enceintes :* chloroquine et quinine sont seules utilisables.

Suivi thérapeutique : les signes cliniques et la fièvre doivent disparaître en 2 ou 3 jours et la parasitémie s'annuler.
En cas de persistance, suspecter une souche de *Plasmodium falciparum* chimiorésistante.
La prophylaxie est nécessaire chaque fois qu'il y a risque de contamination. Elle vise à interdire les piqûres d'anophèles (moyens mécaniques et chimiques) et à traiter préventivement le sujet. Les molécules utilisées sont la chloroquine, le proguanil et la méfloquine selon des schémas préconisés par l'OMS ; le traitement préventif doit s'étaler sur toute la période du risque de contamination et se poursuivre 4 ou 6 semaines après.

Pour en savoir plus

- AFECT. « Antipaludiques » in *Traité de chimie thérapeutique*. Vol V, t II. Technique et documentation ; Paris 2000 : 13-137.
- Malvy D., Djossou F., Receveur M.-C., Le Bras M. *Plasmodies : traitement, prévention*. Encyclopédie médicale et chirurgicale ; Elsevier Paris 2000 : 8-507-A-25.
- Malvy D., Djossou F., Thiebaut R., Le Bras M. *Plasmodies – Malaria. Formes cliniques, diagnostic*. Encyclopédie médicale et chirurgicale ; Elsevier Paris 2000 : 8-507-A-20.
- Martet G., Peyron F. *Diagnostic du paludisme* : http://asmt.louis.free.fr/diagnostic.html
- Nozais J.-P., Datry A., Danis M. *Traité de parasitologie médicale*. Pradel Paris 1996 : 99-138.
- Wéry M. *Protozoologie médicale*. Agence francophone pour l'enseignement et la recherche & De Boeck Université, Bruxelles 1995.

Helminthoses intestinales et hépatiques

S. DEBLOCK, T. DURIEZ
Laboratoire de parasitologie, faculté de pharmacie, Lille.

Conformément au programme limitatif du concours d'Internat en pharmacie, seront traitées ci-après :

- *chez les helminthoses intestinales : la tæniase à Tænia saginata, la bilharziose à Schistosoma mansoni, l'oxyurose à Enterobius vermicularis et l'anguillulose à Strongyloïdes stercoralis ;*
- *chez l'helminthose hépatique : la fasciolose à Fasciola hepatica.*

Pour chacune des différentes espèces parasitaires seront d'abord détaillés successivement la biologie, l'épidémiologie, les principaux signes cliniques en tant que « signes d'appel », les bases du diagnostic biologique, du traitement et celles des mesures prophylactiques.

Les helminthes ou vers rassemblent des métazoaires triploblastiques (à 3 feuillets embryonnaires) et acœlomates (dépourvus de cavités cœlomiques).

Ils se divisent en deux embranchements : celui des Plathelminthes (vers plats) et celui des Némathelminthes (vers ronds) selon les critères simplifiés suivants :

- *corps mou aplati dorso-ventralement, des organes de fixation, état hermaphrodite, reproduction sexuée et asexuée par bourgeonnement : les Plathelminthes ;*
- *corps ferme, cylindrique, sans organes de fixation, sexes séparés, reproduction uniquement sexuée : les Némathelminthes.*

I. Embranchement des Plathelminthes

A. Caractères généraux

Les Plathelminthes ou vers plats présentent à l'état adulte un corps aplati, un tégument mou, une absence de cavité générale remplacée par un parenchyme plein, une reproduction sexuée d'individus hermaphrodites. La fécondation est interne. Le développement larvaire a lieu avec métamorphose et certaines larves sont susceptibles de se multiplier par un phénomène de bourgeonnement. Les cycles évolutifs sont obligatoirement hétéroxènes car les stades adultes et larvaires sont hébergés par deux hôtes différents qui assurent l'alternance des générations. De ce fait, les formes adultes chez les hôtes définitifs tels que l'homme ne se multiplient jamais *in situ*. Un nombre élevé de parasites résulte donc d'une infestation multiple, consécutive à une ou plusieurs ingestions successives de formes contaminantes ou à une pénétration transcutanée dans le cas des schistosomes.

Toutes les parasitoses engendrées sont filles du « péril fécal », d'origine humaine stricte ou mixte (humaine et animale).

Division systématique

- Adulte à corps segmenté ; absence de tube digestif, une croissance continue, un embryon hexacanthe cilié ou non : classe des Cestodes ;
- Adulte à corps non segmenté ; un tube digestif incomplet, une croissance limitée, un embryon miracidial cilié : classe des Trématodes.

B. Classe des Cestodes

1. Caractères généraux des cestodes

a) Caractères biologiques

Les cestodes sont des parasites bihétéroxènes obligatoires. Au stade adulte, ils sont toujours parasites du tube digestif des vertébrés hôtes définitifs (HD) ; au stade larvaire, ils sont parasites d'hôtes intermédiaires (HI), vertébrés ou non, selon l'espèce de ver considérée, au niveau d'organes variés mais bien définis en fonction de l'espèce. L'hôte définitif s'infeste par ingestion de tout ou partie de l'hôte intermédiaire contenant une ou plusieurs larves mûres du parasite, improprement qualifiées de « métacestodes ». La spécificité des cestodes pour leurs hôtes est très ou assez stricte tant à l'état adulte qu'à l'état larvaire ; ce caractère domine l'épidémiologie des affections engendrées.

b) Caractères morphologiques

Les cestodes sont divisés en 2 ordres : les Cyclophyllidés et les Pseudophyllidés. L'espèce *Tænia saginata* est la seule espèce traitée ici, nous n'exposerons donc que les caractères de l'ordre des Cyclophyllidés auquel elle appartient. Cependant, les illustrations jointes s'appliquent conjointement aux deux ordres.
Les cestodes adultes s'accrochent à la muqueuse intestinale de leur hôte définitif par leur extrémité antérieure constituée d'un scolex muni de ventouses musculeuses et, parfois, d'un rostre terminal garni de crochets chitinoïdes disposés en couronne ; un cou filiforme fait suite au scolex, puis un corps allongé et aplati divisé en une succession d'anneaux ou segments d'anatomies toutes semblables, mais dont la maturité sexuelle n'est atteinte que progressivement, au fur et à mesure que leur croissance les éloigne de l'extrémité antérieure du corps.

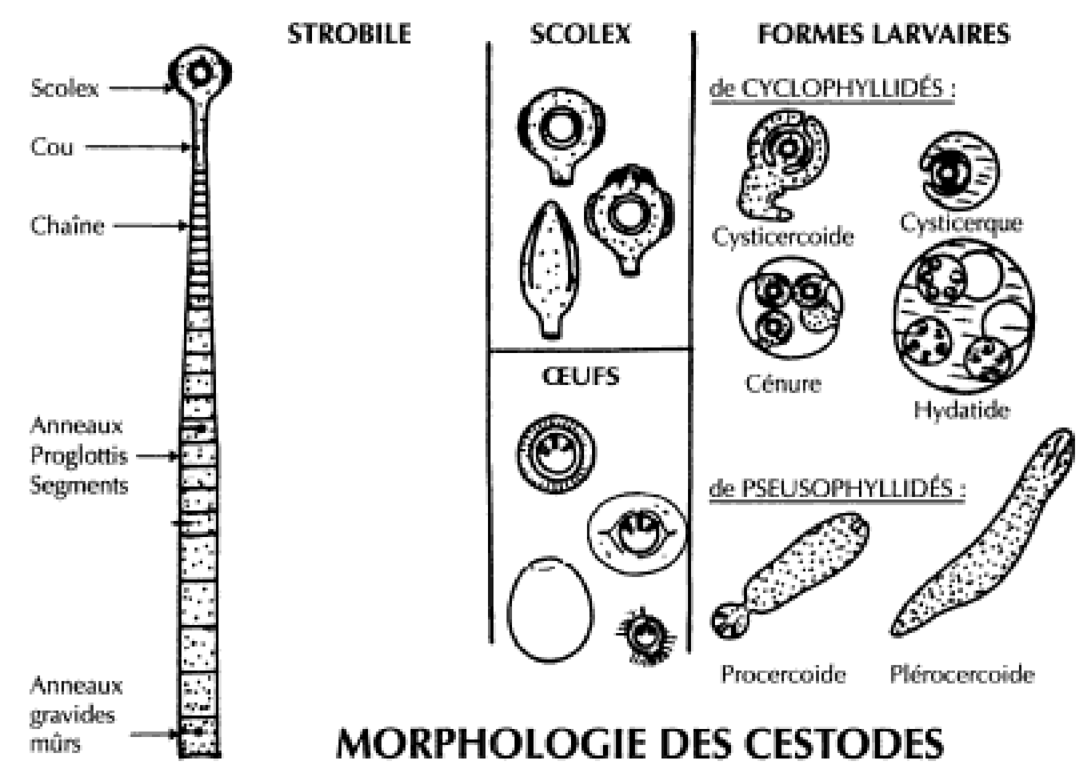
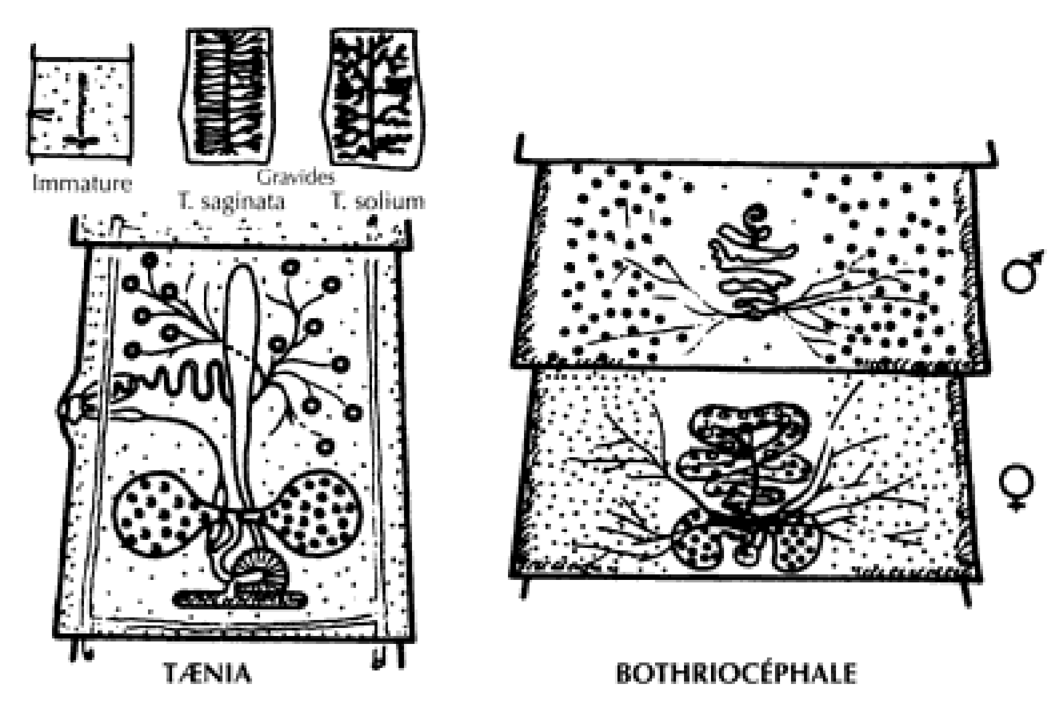


Figure 1. Morphologie des cestodes adultes et de leurs formes larvaires



Cyclophyllidés à gauche (Taenia) et Pseudophyllidés à droite (Bothriocéphale) où les appareils reproducteurs mâles et femelles ont été artificiellement disjoints (les anneaux sont hermaphrodites).

Figure 2. Morphologie des anneaux de cestode

Les cestodes étant dépourvus de tube digestif, leur nutrition a lieu à partir du chyle de l'hôte par l'intermédiaire de la surface du strobile, au travers du tégument qui agit à la façon d'un entérocyte.

Les anneaux mûrs ou gravides présentent un utérus sacculaire plein d'œufs contenant une larve ou embryon hexacanthe, sphérique et armée de six crochets. Les œufs sont émis dans le milieu extérieur par l'intermédiaire des selles de l'hôte définitif. Leur embryon hexacanthe est infestant par ingestion pour l'hôte intermédiaire réceptif.

Les stades larvaires parasites des hôtes intermédiaires sont très différents morphologiquement des formes adultes et il en existe plusieurs types selon les genres. Dans le cas de *Tænia saginata*, il s'agit d'une larve cysticerque monocéphale et liquidienne.

c) Rôle pathogène des cestodes adultes

La maladie conférée par la présence d'un ou plusieurs cestodes adultes dans le grêle chez l'homme est désignée sous le terme général de tæniase. Il existe des porteurs asymptomatiques mais lorsque la maladie se déclare, elle peut être la source de désagréments divers plus ou moins mal supportés par le patient, d'ordre général, digestif ou nerveux, souvent imbriqués. La parasitose est toujours bénigne. Les principaux symptômes sont tous aspécifiques ; on peut citer : douleurs abdominales, nausées, troubles du transit, prurit anal, asthénie, amaigrissement, boulimie, anorexie, fringales subites, anémie, céphalées, vertiges, nervosisme, anxiété, troubles allergiques.

2. Tænia saginata ou ténia inerme

a) Caractères morphologiques

Le scolex a la taille d'une tête d'épingle piriforme (1,5 mm de diamètre), avec 4 ventouses musculeuses mais sans rostre armé (d'où le nom d'inerme). Le strobile mesure entre 4 m et 8 m, il est segmenté en une succession d'anneaux tous identiques (plusieurs centaines) mais dont la maturation est progressive à partir du cou. Les anneaux les plus antérieurs sont jeunes et immatures, puis viennent les anneaux sexués hermaphrodites dits « mûrs », à peu près carrés, et enfin les anneaux postérieurs gravides rectangulaires dont les derniers contiennent de nombreux œufs infestants. Les œufs sont disposés au sein d'un utérus clos formé d'un axe longitudinal portant de nombreuses ramifications latérales (> 20) fines et non dichotomisées. Latéralement, chaque anneau porte un pore génital saillant droit ou gauche de façon assez régulièrement alternée *(fig. 1 et 2)*. Ces caractères anatomiques sont différents chez *Tænia solium* et permettent de porter un diagnostic précis d'espèce en absence du scolex (armé de crochets chez *Tænia solium*).

b) Caractères biologiques

Le cycle évolutif est bihétéroxène, les deux hôtes étant obligatoires et spécifiques. *L'hôte définitif* est l'homme ; il héberge dans son intestin grêle, au niveau du jéjunum, la forme sexuée adulte du parasite sous forme du strobile. Les anneaux mûrs s'en détachent spontanément un par un ; d'abord entraînés par le péristaltisme intestinal, ils vont ensuite forcer activement le sphincter anal par des mouvements de reptation, certains anneaux pourront être éliminés avec les selles. En moyenne, un ver libérera 10 anneaux chaque jour.

Dans le milieu extérieur, les anneaux mûrs contiennent plusieurs dizaines de milliers d'œufs dont la moitié environ sont matures, ils se dessèchent ou se dissocient et libèrent les œufs embryonnés qu'ils contiennent. Les œufs parvenus sur le sol sont disséminés par l'eau de ruissellement ou la terre humide.

L'hôte intermédiaire exclusif est un bovidé jeune (le veau en Europe). Il s'infeste par ingestion des œufs. L'embryon hexacanthe est libéré dans l'intestin grêle par les sucs digestifs ; il traverse activement la muqueuse intestinale grâce à ses crochets puis est transporté passivement par la circulation sanguine jusqu'aux muscles striés où il se fixe. La métamorphose de l'embryon en larve cysticerque sera effective en 2 ou 3 mois. La larve (*Cysticercus bovis*) est localisée dans le conjonctif inter-myocytaire ; c'est une vésicule blanche translucide d'environ 10 mm de diamètre, allongée dans le sens des fibres, qui contient un unique scolex.

L'ingestion de viande de bovin crue ou insuffisamment cuite, contenant la larve cysticerque vivante, contamine l'homme. Le scolex invaginé du cysticerque se dévagine dans le grêle et bourgeonne la chaîne des anneaux. La maturité est obtenue après 3 mois et se signale par l'extériorisation des premiers anneaux gravides. La longévité du ver est de plusieurs années en absence de traitement.

La dissémination des œufs dans la nature explique que, sauf exception, le bovin n'est généralement parasité que par un nombre relativement faible de cysticerques. Aussi, la détection des carcasses infestées est-elle assez aléatoire aux abattoirs. Le premier ver installé chez l'homme entraîne un état de prémunition empêchant l'implantation des autres vers de même espèce, d'où l'état solitaire extrêmement fréquent du parasite adulte.

À Taïwan a été décrite *Tænia asiatica* considérée comme une sous-espèce de *Tænia saginata*, dont le cycle admet comme hôtes intermédiaires le porc et le bétail.

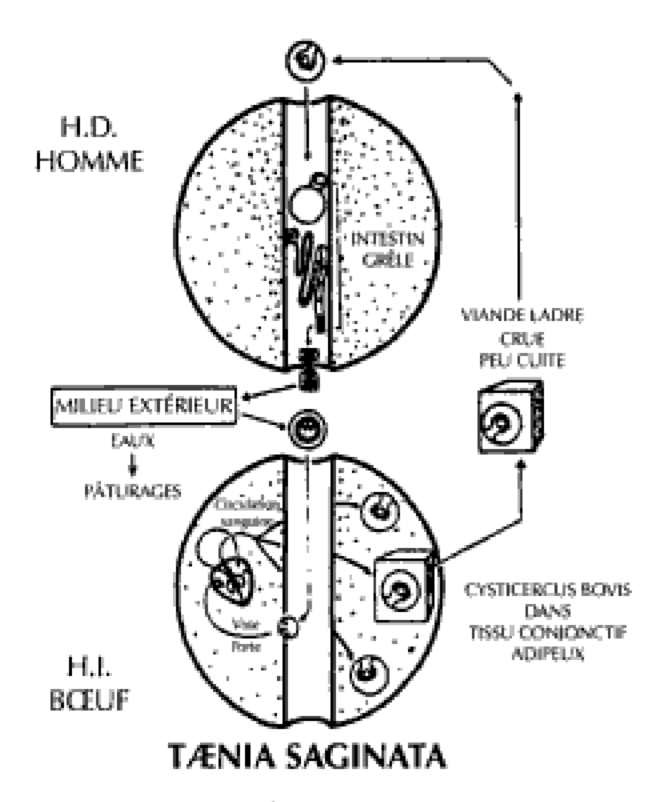


Figure 3. Cycle évolutif hétéroxène de *Tænia saginata*

c) Caractères épidémiologiques

Les règles de la spécificité parasitaire font que la parasitose humaine à *Tænia saginata* est une anthroponose stricte. Elle est de répartition cosmopolite. Les causes favorisant son maintien dans les pays développés sont :

- la consommation de viande bovine qui augmente avec l'élévation du niveau de vie ;
- les habitudes culinaires (consommation de bœuf saignant et parfois cru) ;
- la détection difficile des cysticerques dans les carcasses ;
- la présence de porteurs sains ou pauci-symptomatiques jouant le rôle de réservoir de parasite (surtout dans les régions d'élevage où se réalise la contamination semi-directe du bétail par l'homme parasité lors de ses exonérations à l'étable ou aux pâturages) ;
- les anneaux isolés desséchés.

Dans le milieu extérieur humide, les œufs résistent mieux au froid (15 jours à – 30 °C, 2 mois à – 4 °C, 5 mois à + 4 °C) qu'à la chaleur, mais ils sont sensibles à la dessiccation. En France, la prévalence de la parasitose dans la population est de 1 % (environ 500 000 cas déclarés chaque année) alors que la prévalence de la cysticercose bovine est officiellement de l'ordre de 1 à 2 % ; en fait, cette dernière doit être chiffrée aux environs de 10 à 15 % des bovins.

L'homme ne peut jamais jouer, pour des raisons physiologiques tenant à la composition de ses sucs digestifs, le rôle d'un hôte intermédiaire pour *Tænia saginata* (à la différence du *Cysticercus cellulosae* de *Tænia solium*) et héberger le *Cysticercus bovis* dans ses muscles. Le parasite ne détermine donc jamais de cysticercose humaine musculaire ou cérébrale.

d) Rôle pathogène

Il n'y a pas de période prépatente cliniquement décelable. À la période d'état, l'homme parasité souffre de tæniase. De nombreux porteurs sont asymptomatiques ou pauci-symptomatiques. Quand des troubles se manifestent, ils sont souvent aspécifiques et d'ordre digestif (nausées, troubles du transit) ou de l'appétit (boulimie, anorexie), ou nerveux (nervosisme, anxiété).
Un signe d'orientation constant à la phase d'état est la perception du franchissement du sphincter anal par les anneaux mobiles et leur reptation sur la muqueuse et la peau. Le phénomène a souvent lieu le soir ou la nuit.
Un syndrome appendiculaire peut être dû à l'engagement d'anneaux dans la lumière de l'appendice, mais il est assez exceptionnel.
Il n'existe pas d'immunité protectrice ; si la présence intestinale d'un ver vivant empêche la surinfestation, un sujet déparasité redevient réceptif au tænia.

e) Diagnostic biologique

À la période prépatente, avant l'émission des anneaux mûrs, le diagnostic est impossible. Une hyperéosinophilie modérée (entre 20 et 30 % des leucocytes soit jusqu'à 5 G/L au maximum) et transitoire pourrait être décelée, mais rien ne justifie un examen hématologique à ce moment-là. De plus, l'éosinophilie considérée isolément est insuffisante pour orienter le diagnostic vers une tæniase.
À la phase d'état, le diagnostic est toujours direct.

Diagnostic parasitologique direct

- Mise en évidence des anneaux. Bien souvent, c'est le porteur du ver qui fait lui-même le diagnostic, alerté par l'émission des anneaux mûrs et leur découverte dans le linge et la literie. Ces anneaux mesurent entre 1,5 et 2 cm de long et entre 0,5 à 1 cm de large pour une épaisseur de 0,1 cm ; ils sont blancs, souples et mobiles (aspect de nouille cuite) et leur pore génital latéral est saillant. Les anneaux frais observés par transparence entre deux lames serrées montrent les ramifications utérines caractéristiques de l'espèce. Desséchés, ils sont raccourcis, translucides puis jaunâtres, cassants et naturellement immobiles ; ils seront examinés après réhydratation.
  Lors du franchissement du sphincter anal, les deux extrémités de l'anneau peuvent libérer des œufs qui seront décelés par le test à la Cellophane adhésive de Graham (scotch test) décrit pour l'oxyurose et pratiqué dans les mêmes conditions opératoires ;
- Mise en évidence des œufs. L'œuf possède une double coque. La coque externe, hyaline et mince, est fragile et se déchire facilement. Souvent, seule la coque interne et son contenu seront visibles, on parlera alors d'embryophore. L'embryophore est subsphérique et de couleur brune, il mesure entre 30 et 40 µm de diamètre. Au centre d'une coque épaisse et radiée se situe un embryon caractérisé par ses 6 crochets visibles à frais (embryon hexacanthe).
  Les œufs ne se trouveront dans les selles que dans les cas exceptionnels où un anneau s'est ouvert dans le tube digestif ; la coproscopie est donc souvent négative. Le test de Graham la remplace avantageusement.
  Le diagnostic indirect n'est pas utilisé.

f) Thérapeutique

Le traitement de la tæniase à *Tænia saginata* consiste en l'administration de niclosamide (Trédémine®). Le matin, le sujet adulte, à jeun depuis la veille, absorbe 2 comprimés puis 2 autres 1 heure plus tard. L'alimentation sera reprise 3 heures après. La niclosamide ne passe pas la barrière intestinale. Le praziquantel (Biltricide®) est le traitement moderne de la tæniase par administration d'une dose unique de 10 mg/kg. Chez l'enfant et la femme enceinte, préférer le praziquantel ou la semence de courge fraîche pilée suivie d'une purgation saline. Les deux molécules citées entraînent la mort du parasite. Il est donc inutile de constater l'élimination du scolex. Cependant, les œufs matures contenus dans les anneaux restent infectieux après la mort du ver.

g) Prophylaxie

• Vis-à-vis du réservoir de parasite humain

Les fragments de chaîne, éliminés spontanément ou éventuellement avec les matières fécales du sujet lors d'une thérapeutique active, contiennent des œufs vivants. Aucun ténicide n'est ovicide ; il convient en conséquence de détruire tous les anneaux en les brûlant ou les ébouillantant, pour limiter la transmission du parasite. L'éducation sanitaire des populations est donc indispensable.

L'élimination d'anneaux de cestodes dans la cuvette des WC est un non-sens de prophylaxie parasitaire dans ce cas ; les œufs se retrouvent dans les boues d'épandage (lorsque les stations d'épuration existent) qui seront finalement pulvérisées sur les champs ou les pâtures. Un domicile sur 3 en France rejette ses eaux usées directement dans la nature.

• Vis-à-vis de l'hôte intermédiaire bovidé

Inspection sanitaire à l'abattage (recherche systématique des cysticerques dans le muscle cardiaque ou les masséters) suivie de la congélation des carcasses parasitées (8 jours à – 15 °C), ingestion de viande suffisamment cuite (+ 56 °C nécessaires pour tuer le cysticerque) ou congélation prolongée préalable. L'éducation sanitaire des éleveurs devrait proscrire l'exonération ou le rejet des anneaux à l'étable ou au pré.

C. Classe des Trématodes

1. Caractères généraux des trématodes

a) Caractères biologiques

Les trématodes sont des parasites obligatoires bi ou trihétéroxènes selon l'espèce. À l'état adulte, ils sont parasites du tube digestif ou d'autres organes cavitaires (canaux biliaires, bronches, système veineux…) des hôtes définitifs vertébrés ; à l'état larvaire, ils sont parasites d'un mollusque souvent aquatique, hôte intermédiaire siège de phénomènes très actifs de reproduction asexuée, assurée par bourgeonnement.

Les trématodoses se contractent soit par ingestion d'une forme infestante enkystée (cas des douves), soit par pénétration transcutanée d'une forme larvaire libre (cas des schistosomes).

b) Caractères morphologiques

- Les trématodes adultes parasites de l'homme sont des vers foliacés non segmentés, de taille comprise entre 1 cm et 7 cm de longueur sur 0,2 mm et 15 mm de largeur. Ils se fixent dans la lumière des organes creux par deux ventouses musculeuses, d'où leur nom de distomes. Leur corps non segmenté contient un tube digestif incomplet et des organes reproducteurs complexes, mâle et femelle, construits sur le même modèle que celui des anneaux de cestodes. Les œufs sont toujours pondus et s'éliminent dans le milieu extérieur par les voies naturelles et les excreta (bile et selles dans le cas restrictif des trématodes de la question). La longévité des vers adultes est souvent considérable (5, 10 ou 20 ans, parfois davantage). Les douves sont hermaphrodites ; par exception, les schistosomes sont gonochoriques (à sexes séparés), la femelle est cylindrique alors que le mâle est foliacé ;
- Les trématodes larvaires, parasites des mollusques, n'ont aucune parenté morphologique avec l'adulte. Le point de départ du cycle larvaire est constitué par une larve ciliée, ou miracidium, présente dans l'œuf embryonné. Son aspect extérieur évoque un infusoire ou cilié. Parvenu activement ou passivement chez le mollusque hôte intermédiaire, le miracidium se métamorphose en un sporocyste qui, par bourgeonnement, donne naissance à des rédies, elles-mêmes sources de nombreuses cercaires appelées à mener une vie aquatique libre, mais éphémère (24 heures). Leur forme évoque celle d'un têtard microscopique (entre 150 et 250 µm de long), avec un appendice caudal locomoteur. La destinée des cercaires est :
  - soit de se transformer en métacercaires enkystées, formes d'attente de longévité prolongée fixées solidement sur un support végétal (cas de *Fasciola hepatica*) ou chez un animal HI2 (dans le cas non traité ici des autres douves),
  - soit de traverser activement la peau de l'hôte définitif (cas des schistosomes). Dans ce cas, on note l'absence d'un second hôte intermédiaire ou d'enkystement dans la nature.

c) Rôle pathogène des douves

La maladie engendrée par la présence d'une ou plusieurs douves dans le viscère constituant leur habitat électif chez l'hôte définitif est appelée du terme général de « distomatose » (intestinale, pulmonaire ou hépatique). Il existe des porteurs asymptomatiques ; la gravité des symptômes cliniques déclarés apparaît en rapport avec le nombre des parasites et leur localisation.

Dans les voies biliaires intrahépatiques, la présence des parasites est génératrice d'adénomes biliaires (hyperplasie endothéliale et conjonctive de la paroi des canaux biliaires). Cette lésion élémentaire entraîne de la stase biliaire puis, lors de la chronicité, hépatite et cirrhose du parenchyme.

Les lésions sont également susceptibles de s'infecter. Cette action pathogène entraîne l'apparition de symptômes multiples aigus ou chroniques : douleurs de l'hypocondre droit, coliques hépatiques, troubles digestifs, vomissements bilieux, épisodes pseudo-lithiasiques, obstruction biliaire, ictère par rétention, angiocholite aiguë à rechute par infection bactérienne rétrograde (à partir des bactéries digestives), insuffisance hépatique dégénérative, anémie, œdème des membres inférieurs, ascite, mort éventuelle dans les cas graves.

En résumé, c'est la présence des douves adultes qui est la cause directe de la pathologie.

d) Rôle pathogène des schistosomes

La présence de plusieurs couples de schistosomes adultes dans l'appareil circulatoire de l'homme est bien tolérée. La pathogénie est due aux modalités particulières d'extériorisation des œufs pondus par la femelle dans les veinules et les capillaires des organes creux (intestin, vessie) ou des organes pleins (foie).
Ces œufs sont de grande taille et munis d'un éperon dont la position est variable suivant les espèces ; l'embryon ou miracidium qu'ils contiennent sécrète des enzymes lytiques chargées de leur ouvrir la voie au sein des tissus qui les emprisonnent. Ces particularités morphologiques et biologiques leur permettront de traverser l'endothélium vasculaire puis la sous-muqueuse et la muqueuse de l'organe, pour tomber dans sa lumière. Ce trajet, qui dure plusieurs semaines et correspond à la période de maturation de l'œuf, constitue une agression pour le tissu. Une certaine proportion d'œufs réussissent leur migration et pourront s'extérioriser ; les autres restent prisonniers des tissus et entraînent des réactions locales importantes telles que des granulomes centrés sur les œufs.
La pathologie dépendra donc de la localisation des pontes (en relation avec l'espèce de schistosome considéré), du nombre des femelles fertiles et de l'ancienneté de la parasitose.
Après une phase de pénétration souvent silencieuse, la phase d'invasion simule souvent une maladie infectieuse fébrile. La phase d'état se caractérise d'abord par une pathologie locale (intestinale ou vésicale) détaillée avec chaque espèce, puis des complications plus tardives dues à l'accumulation des œufs emprisonnés dans les lieux de ponte habituels et anormaux (foie). Les granulomes formés autour de ces œufs peuvent entraîner une dégénérescence du parenchyme et des troubles circulatoires importants consécutifs peuvent ensuite apparaître.
En résumé, c'est la présence et la migration des œufs de schistosomes dans les tissus qui est la cause des signes cliniques.

2. Douves

a) *Fasciola hepatica* ou grande douve du foie

• Caractères morphologiques

Corps aplati lancéolé, brun pâle, entre 20 et 30 mm de long et entre 8 et 13 mm de large. Ventouse orale placée à l'extrémité d'un petit prolongement antérieur du corps ou « cône céphalique ».
Tous les organes reproducteurs ramifiés (ovaire antérieur, testicules postérieurs en tandem, vitellogènes latéraux) ; cœcums longitudinaux également ramifiés. Utérus antérieur en rosette. Un pore génital sert d'orifice de ponte.

• Caractères biologiques

Douves localisées dans la lumière des canaux biliaires des animaux domestiques d'élevage (ovins, bovins) essentiellement, et accidentellement de l'homme.
Cycle évolutif : Cycle indirect bihétéroxène, avec migration interne entéro-hépatique obligatoire.
Les vers adultes fécondés pondent des œufs non embryonnés qui suivent la filière naturelle (canaux biliaires, cholédoque, intestin) pour être éliminés dans le milieu

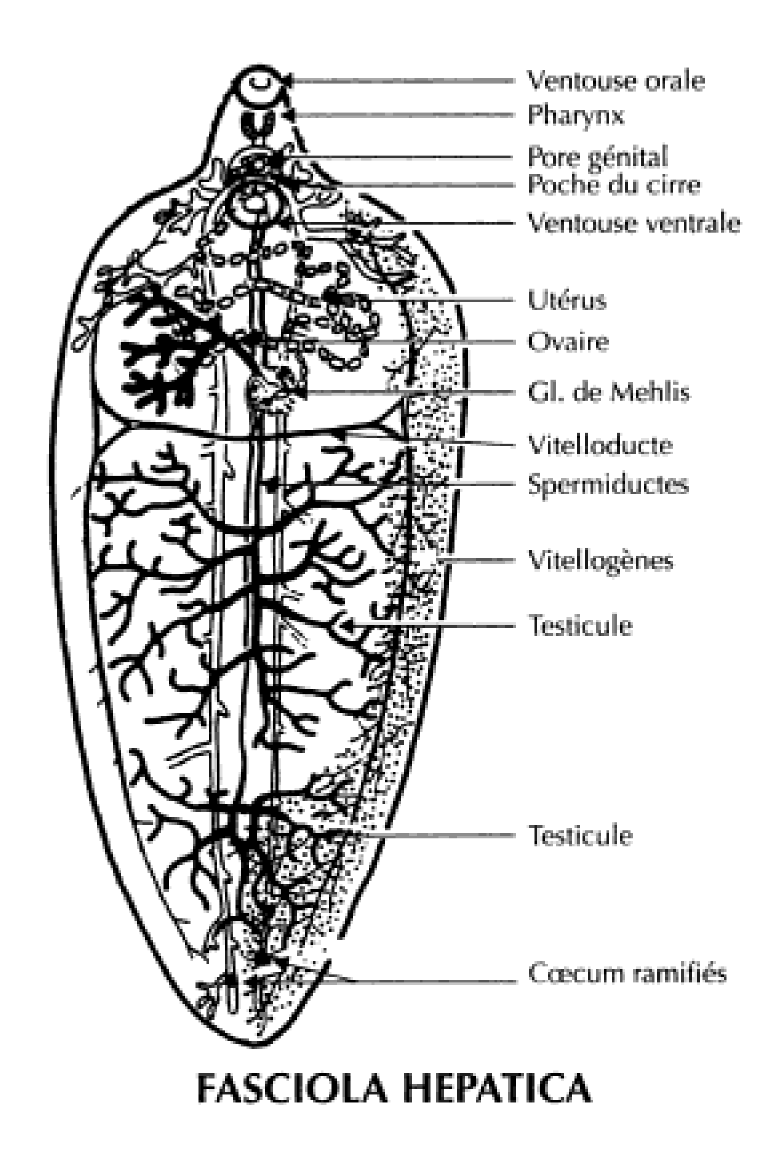
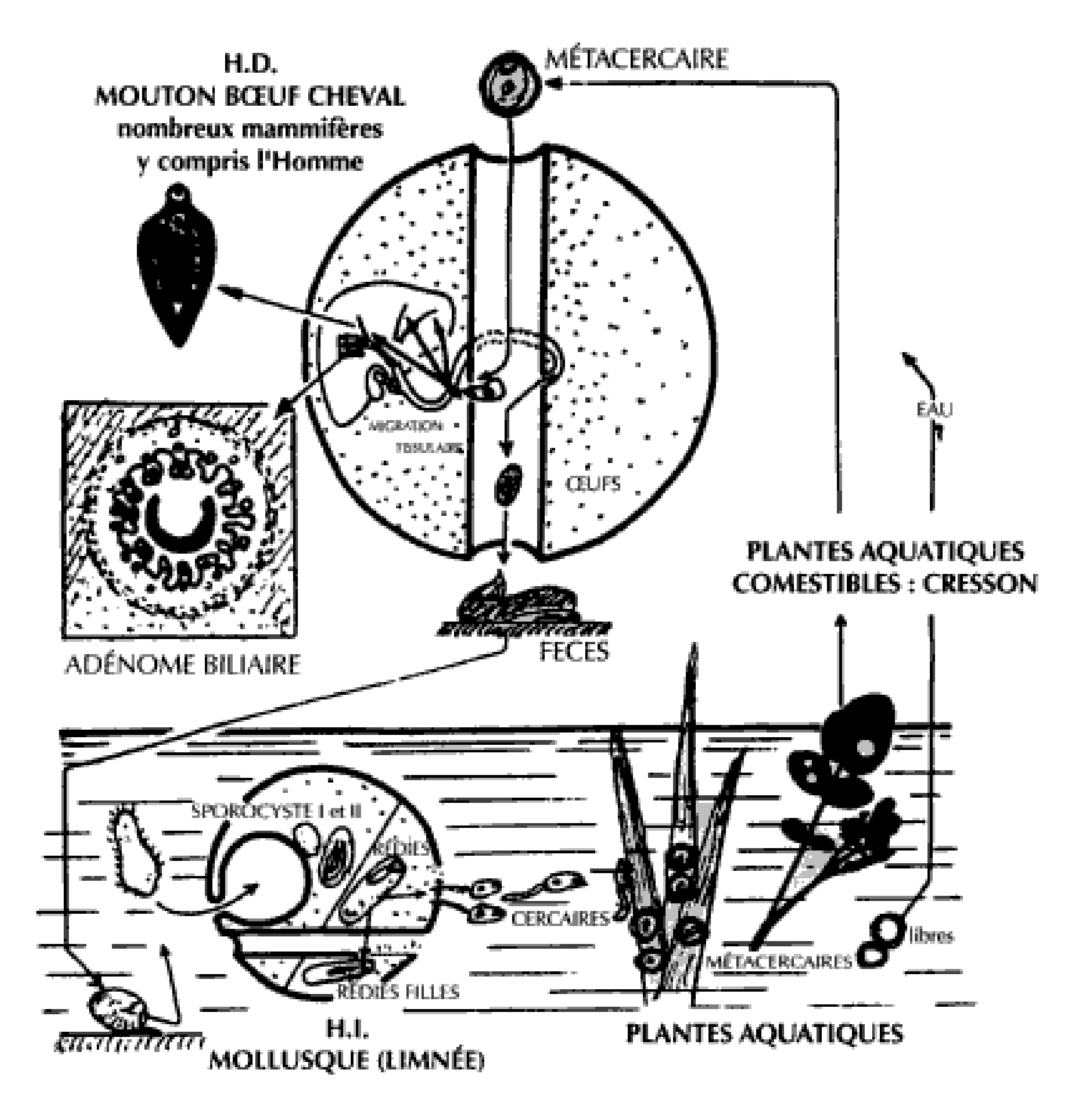


Figure 4. Anatomie de la grande douve du foie adulte, *Fasciola hepatica*

extérieur avec les déjections. Ils s'embryonnent dans l'eau en 3 semaines à une température supérieure à 10 °C et éclosent à la lumière. Le miracidium pénètre dans un petit mollusque aquatique d'une seule espèce, présent dans les ruisselets et les nappes d'eau sans profondeur des pâtures humides, *Lymnæa truncatula* (gastéropode pulmoné). Deux à trois mois plus tard selon la température, le mollusque parasité émet dans l'eau de nombreuses cercaires longues de 800 µm environ, qui s'enkystent presque immédiatement, en quelques minutes, sur un support immergé, et s'entourent d'un kyste de 250 à 300 µm de diamètre, très résistant (survie de la métacercaire enkystée atteignant facilement plusieurs mois et résistant au gel). Le kyste est infestant, par ingestion avec son support végétal. Au contact des sucs digestifs et de la bile, la métacercaire éclôt et la douvule entreprend sa migration transviscérale : elle traverse la paroi du grêle, chemine dans la cavité péritonéale en direction du foie dans lequel elle pénètre ; elle creuse un sillon en se nourrissant du parenchyme pendant une semaine et s'installe dans un canal biliaire où elle s'immobilise pour achever sa croissance en deux mois et demi environ, à partir desquels les pontes commencent. Nutrition à base de cellules épithéliales biliaires et de sang.



GRANDE DOUVE DU FOIE

Figure 5. Cycle évolutif hétéroxène de *Fasciola hepatica*

• Caractères épidémiologiques

Zoonose cosmopolite, grave, endémique, commune dans toutes les régions d'élevage humides où les pâtures peuvent être temporairement inondées et où existe l'hôte intermédiaire spécifique. Ovins, caprins et bovins constituent l'essentiel du réservoir de parasites ; les fortes infestations leur sont mortelles (plus de 1 000 vers par hôte). L'homme n'est qu'un hôte occasionnel. Sa contamination a lieu par l'ingestion de végétaux crus cueillis dans les pâturages où le bétail est infesté, de préférence en fin d'été ou à l'automne, période où la densité des métacercaires est maximale (cas de la France). L'hibernation des limnées dans le sol interrompt le cycle en hiver.

La maladie humaine est donc sporadique, plutôt saisonnière, souvent constituée de petites épidémies locales de type familial ou communautaire, dont la source est la consommation collective de végétaux crus de pâturages. L'hôte humain, peu adapté au parasite comme les bovins, et à la différence des ovins et caprins, souffre beaucoup de sa parasitose, même avec une charge parasitaire faible (moins de 5 vers).

• Rôle pathogène : fasciolose

Il existe peu de porteurs asymptomatiques (20 % des cas). Les troubles observés se partagent en deux périodes, la période d'invasion et la période d'état.

Période d'invasion (2 premiers mois) propre au parasite, ou période d'hépatite toxi-infectieuse. Elle est dominée par des phénomènes de type infectieux : fièvre prolongée irrégulière, troubles digestifs (anorexie, subictère), hépatomégalie et foie douloureux.

Troubles généraux (asthénie). Réactions allergiques cutanées ou pulmonaires, migraine. Hémogramme : anémie, hyperleucocytose > 10 G/L et hyperéosinophilie : plusieurs Giga par litre (de 20 à plus de 50 % de la formule leucocytaire).

Ces manifestations sont la traduction de la migration transhépatique des douvules, génératrices de sillons de pénétration et de foyers de nécrose étendus, et d'hyperleucocytose toxique et allergique.

Période d'état de longue durée à partir du 3[e] ou du 4[e] mois d'infestation où les douves sont adultes et obstruent les voies biliaires.

Elle est caractérisée par un tableau au long cours d'angiocholite à rechutes, de coliques hépatiques et de lithiase biliaire, évoluant par crises successives ; une évolution cirrhogène est possible.

• Diagnostic biologique

Le diagnostic d'une fasciolose est à établir de préférence à la période *d'invasion*, seul moment où l'infection est aisément curable sans séquelles graves (douvules en migration se nourrissant du parenchyme hépatique) mais où la parasitose est coprologiquement muette (absence d'extériorisation d'œufs en raison de l'immaturité du parasite). À ce stade, le diagnostic est orienté par la clinique et la notion de repas contaminant (végétaux aquatiques, cressons crus) quelques jours avant l'apparition des premiers signes cliniques.

La suspicion du diagnostic est orientée par l'hématologie (ascension rapide du taux d'éosinophiles chez un sujet n'ayant pas quitté la métropole). La confirmation est apportée par la séro-immunologie qui se positive à la fin du premier mois d'infestation.

Les techniques sérologiques utilisées sont, pour le dépistage, l'électrosynérèse, l'hémagglutination passive, l'Elisa et l'immunofluorescence indirecte. Il y a lieu de confronter ces résultats au bilan parasitologique du malade pour éviter de mal interpréter des réactions positives croisées. La confirmation sera faite par coélecrosynérèse ou immunoempreinte et immunoélectrophorèse.

À la phase d'état, le diagnostic séro-immunologique est couplable au diagnostic direct, qui s'établit par la mise en évidence des œufs. Le diagnostic direct est réalisé soit sur le liquide de tubage duodénal ; soit dans les selles, après application d'une méthode de concentration monophasique du type de celle de Janeckso et Urbanyi à l'iodomercurate de potassium. L'œuf se reconnaît à sa grande taille, 125 µm de long et 75 µm de large, son aspect ovoïde, sa coque mince, operculée, brun clair, et son absence d'embryonnement. Il est souvent rare ou absent des selles chez l'homme, qui est un mauvais hôte, souvent peu parasité.

En cas d'examen coproscopique renouvelé mais toujours négatif, la recherche d'antigènes sériques circulants et de coproantigènes pourrait être réalisée.

Dans le cas rare de distomatose ancienne (plusieurs années), seul le sérodiagnostic sera utilisable.

En résumé : environ 95 % des fascioloses pourront être diagnostiquées par le sérodiagnostic. La proportion de celles qui seront diagnostiquées par la seule coprologie est d'environ 40 %.
Après traitement, le sérodiagnostic montrera une augmentation du taux d'anticorps suivie d'une diminution lente. La négativation se produit en un an environ.

• Thérapeutique
Généralement difficile.
À la phase d'invasion, le traitement de référence était constitué par des injections de déhydroémétine, aujourd'hui abandonnée en raison de sa toxicité.
Actuellement, les médicaments disponibles sont le praziquantel (Biltricide®) et le triclabendazole (Egaten®).
Le praziquantel est moins efficace sur *Fasciola hepatica* que sur les autres trématodes. Selon les études, son efficacité varierait entre 40 et 70 %.
Le triclabendazole est un benzimidazolé douvicide utilisé en médecine vétérinaire. Il est utilisé chez l'homme à la dose unique de 10 mg/kg.
Contrôler l'efficacité des cures par la sérologie, la disparition de l'éosinophilie sanguine et la négativation de la coprologie.

• Prophylaxie
La prophylaxie de la fasciolose humaine est difficile si l'on considère l'abondance du réservoir animal de parasite, très irrégulièrement traité par les éleveurs en France. Il y a lieu de s'abstenir de consommer crus des végétaux sauvages cueillis dans les pâtures marécageuses, et de parfaire l'éducation sanitaire de la population en recommandant, pour le cresson cru, la consommation exclusive de plantes provenant d'exploitations placées sous contrôle sanitaire. Seule une température > 50 °C détruit les métacercaires.
Pour prévenir la contamination du bétail, on peut préconiser le drainage des terrains à limnée tronquée, la destruction des mollusques par épandage biannuel de molluscocides (cyanamide calcique), et encourager le traitement antiparasitaire du cheptel. Le coût de ces mesures les rend peu praticables.
Remarque : *Fasciola gigantica* est une espèce de trématode proche de la précédente du point de vue morphologique et biologique, et trouvée chez le bétail en Afrique et en Asie. Il existe de rares cas humains de cette distomatose.

3. Schistosomes

Les trois principales espèces de schistosomes parasites de l'homme sont :

- *Schistosoma mansoni* en Afrique tropicale, vallée du Nil, Madagascar, Amérique centrale et Amérique du Sud ;
- *Schistosoma hæmatobium* en Afrique comme l'espèce *mansoni* y compris au Maghreb, et en Asie occidentale ; absente d'Amérique ;
- *Schistosoma japonicum* en Asie orientale.

Deux espèces de moindre importance parasitent encore l'homme, en Afrique *Schistosoma intercalatum* et *Schistosoma mattheei* ; en Asie *Schistosoma mekongi*.
Tous les schistosomes sont parasites du système circulatoire.
Nous prendrons comme espèce type *Schistosoma mansoni*.

glande vitellogène et précédé de la glande coquillère (de Méhlis) puis de l'utérus généralement vide d'œufs, pondus un à un. Le pore génital est postérieur à la ventouse ventrale.

• Caractères biologiques

Le cycle évolutif est bihétéroxène.

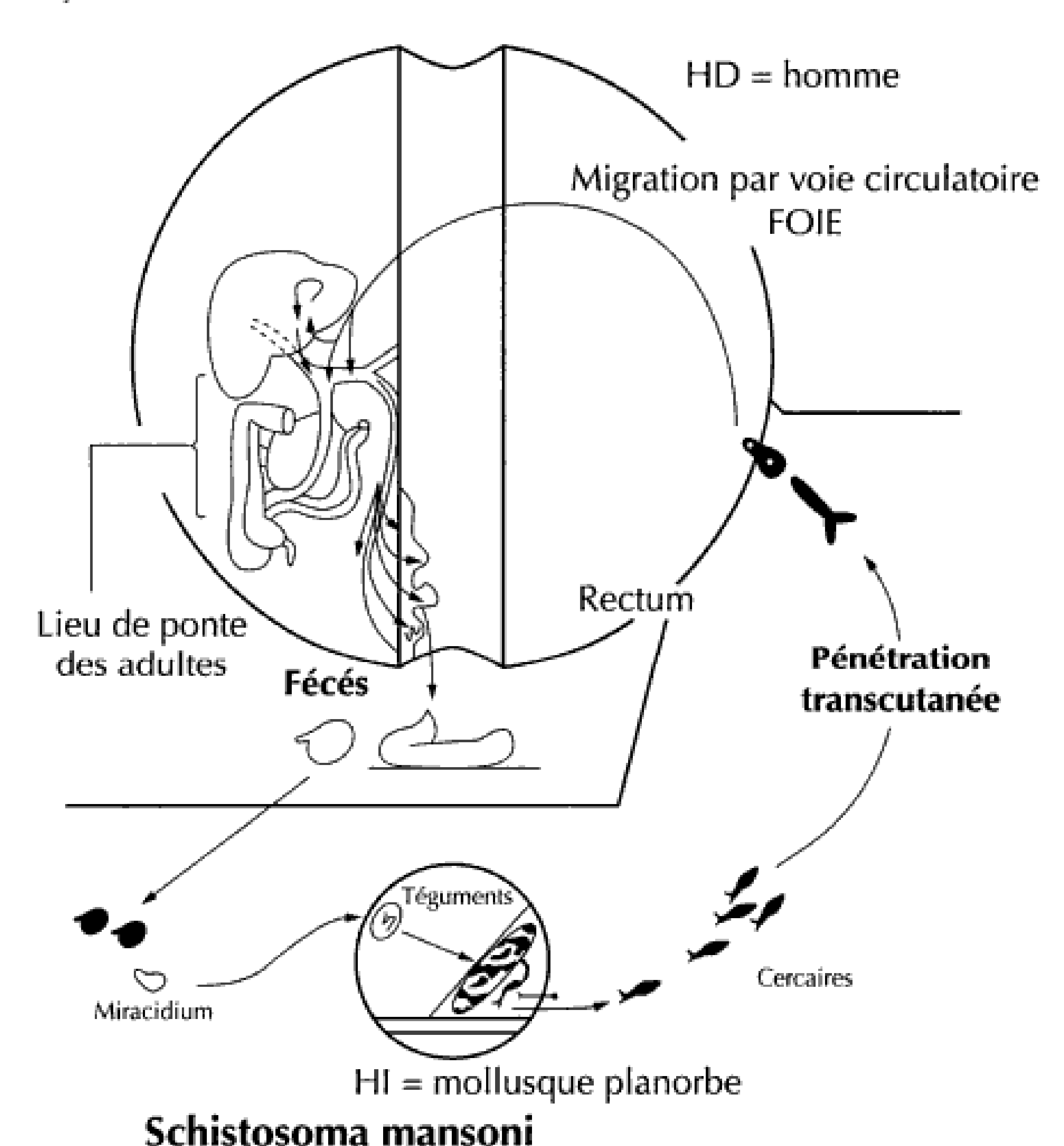


Figure 7. Cycle évolutif général de *Schistosoma mansoni*

– *L'hôte définitif* est essentiellement constitué par l'homme mais occasionnellement, des primates et des rongeurs peuvent être trouvés spontanément parasités dans la nature. Leur rôle épidémiologique reste secondaire, sauf exception. Les vers adultes, mâles et femelles, vivent à l'état jeune dans le système circulatoire veineux de leur hôte définitif, principalement dans les vaisseaux hépatiques du système porte et les veines mésentériques. Les vers sont hématophages.

Les femelles adultes fécondées se déplacent pour aller pondre leurs œufs un par un dans les veinules de la muqueuse rectale à raison d'environ 300 œufs par jour. Ces œufs ne sont pas embryonnés à la ponte et acquièrent leur miracidium en 7 jours environ au sein des tissus de l'hôte. À l'aide de leurs enzymes et de leur éperon, ils entreprennent de traverser la muqueuse rectale pour tomber, au bout de quelques jours ou de quelques semaines, dans la lumière de l'organe. Ils s'extériorisent généralement en surface des fèces. Parvenus dans de l'eau douce suffisamment éclairée, oxygénée et chaude, les œufs éclosent rapidement et libèrent l'embryon cilié ou miracidium (organisme d'environ 0,1 mm), de survie éphémère à l'état libre (24 heures) ; il ne survivra que chez son hôte intermédiaire en s'y transformant.

– *L'hôte intermédiaire* est un mollusque gastéropode pulmoné discoïde (planorbe) aquatique appartenant aux genres *Australorbis* et *Biomphalaria*. Le miracidium y pénètre activement au niveau du pied ou d'un tentacule. Par un processus asexué de polyembryonie, il donnera en 2 mois environ 2 stades sporocystes successifs, le second étant à l'origine de plusieurs milliers de larves mobiles, nageuses ou furcocercaires, constituées d'un corps et d'une queue fourchue, d'une longueur totale de 0,3 mm. Les furcocercaires s'échappent spontanément du mollusque pour rechercher activement leur hôte définitif.
Leur émergence est maximale en milieu de journée.
Leur survie à l'état libre dans l'eau ne dépasse pas 48 heures.
Les tropismes des furcocercaires les poussent à pénétrer les téguments des vertébrés à sang chaud ; elles s'y fixent par leurs ventouses et les traversent en quelques minutes, abandonnant leur queue natatoire à l'extérieur. Si l'hôte est convenable, la maturation se poursuivra. Le parasite appelé alors schistosomule gagne les poumons par voie lymphatique et sanguine, puis les veines du foie où l'accouplement et la fécondation ont lieu environ 35 jours après l'infestation. Ils sont adultes et commencent à pondre 2 à 3 mois après l'infestation. La longévité des adultes atteint en moyenne entre 5 et 10 ans.

- Caractères épidémiologiques

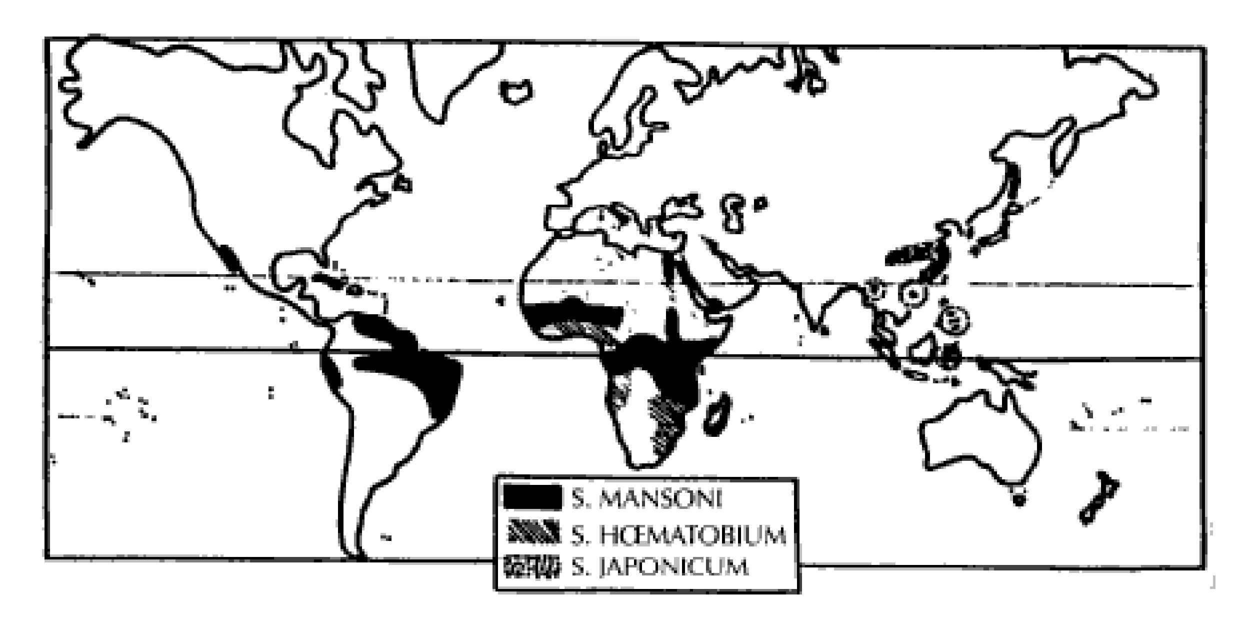


Figure 8. Répartition géographique des bilharzioses

La bilharziose à *Schistosoma mansoni* est une anthroponose liée à la présence d'eau douce et du mollusque hôte intermédiaire spécifique qui exige des mares permanentes, avec une eau claire et une végétation aquatique dense. Le développement des divers stades larvaires du parasite chez le mollusque et l'émergence des furcocercaires nécessitent une température voisine de 25 °C (température optimale de 32 ou 33 °C), du soleil et une eau bien oxygénée. Ces facteurs écologiques localisent le parasite aux zones intertropicales d'Amérique (y compris les Antilles), et d'Afrique (y compris la vallée du Nil et Madagascar), mais à l'exclusion des zones sèches et du Maghreb.
Les facteurs favorisant la maladie sont l'absence d'hygiène fécale, l'utilisation d'eaux sauvages pour les besoins domestiques et tous les contacts homme-eau infestée (toilettes, jeux des enfants, irrigation des cultures, travaux ménagers, pêche...). La création de nouveaux points d'eau, les travaux d'irrigation, la multiplication des voies de communication et les déplacements de population favorisent l'apparition de nouveaux foyers de la maladie et accroissent les risques.
La prévalence de la maladie est d'environ 60 millions d'humains parasités. L'endémie est stable sans fluctuation saisonnière. Des flambées épidémiques peuvent se produire avec l'arrivée de sujets sains en région d'endémie, ou de porteurs de parasites dans des zones encore indemnes mais pourvues de l'hôte intermédiaire convenable.

• Rôle pathogène : bilharziose intestinale ou rectale

Les manifestations cliniques se déroulent en trois phases correspondant aux différents stades évolutifs du parasite chez l'homme.

- *Phase de pénétration* : dermatite allergique prurigineuse localisée au point de pénétration des cercaires lors du bain infestant. L'intensité de la réaction dépend du nombre de cercaires. Les lésions disparaissent en quelques jours. Les faibles infestations ne sont pas remarquées ;
- *Phase d'invasion* ou toxémique. Elle correspond au séjour et à la maturation des parasites au niveau des poumons et du foie et elle dure entre 5 et 6 semaines. Elle simule une maladie infectieuse avec fièvre, asthénie, troubles gastro-intestinaux, hépatosplénomégalie, urticaire et œdème, contemporains d'une hyperleucocytose et d'une hyperéosinophilie élevée (entre 20 et 50 % des leucocytes, soit entre 10 et 20 G/L). Les faibles infestations ne provoquent pas d'incidents révélateurs ;
- *Phase d'état et phase chronique* : à partir de la 6e semaine après le bain infestant, sa gravité dépend de la charge parasitaire. Son expression clinique est en rapport avec la migration des femelles fécondées au niveau de leur territoire électif de ponte, la muqueuse rectale, et résulte de l'accumulation des œufs dans les tissus, de la formation de granulomes périovulaires et d'une hyperplasie conjonctive (polypes) résultant des sécrétions nocives des miracidiums. Les vaisseaux sanguins veineux supportent bien le contact des vers adultes.

  La maladie présente plusieurs degrés de gravité :
  - les petits porteurs sont des porteurs asymptomatiques ou pauci-symptomatiques. Ils jouent le rôle de réservoir de parasite de l'affection, non détectables sans examen de santé particulier,
  - avec un nombre suffisant de parasites, apparaissent des manifestations de dysenterie bilharzienne, épisode aigu de douleurs et de diarrhées dues à l'irritation de la muqueuse rectale par l'accumulation des pontes et accom-

LÉSIONS DUES À S. MANSONI

FOIE
HÉPATOMÉGALIE
Nodules granulaires
Fibrose périportale
CIRRHOSE
hypertrophique
internodulaire
ASCITE ŒDÈMES
RATE
SPLÉNO-MÉGALIE
RECTUM
GRANULOMES
ADÉNO-PAPILLOMES
DYSENTERIE
BILHARZIENNE

Figure 9. Rôle pathogène de *Schistosoma mansoni*

pagnées ou non de saignements en nappe autour des fèces (risque de confusion avec une amibiase colique chronique),

- lors du passage à la chronicité, et en cas de surinfestations permanentes, se manifestent des complications dues à l'accumulation des pontes hors des territoires naturels d'élection (notamment le foie). On note : hépatosplénomégalie, hypertension portale, cirrhose périportale (c'est-à-dire extralobulaire).

En cas d'hyperinfestations apparaissent enfin insuffisance respiratoire et hypertrophie cardiaque ventriculaire droite (« cœur pulmonaire chronique »). Le pronostic de ces complications est grave.

• Diagnostic biologique

La notion de séjour en pays d'endémie et de bains en eau douce contaminée, les signes toxémiques de la phase d'invasion et une hyperleucocytose (entre 10 et 20 G/L) avec l'hyperéosinophilie peuvent faire penser à l'éventualité d'une bilharziose récemment acquise. La démarche diagnostique varie en fonction de la chronologie des manifestations cliniques.

Elle fera appel, selon l'opportunité, au diagnostic immunologique qui précédera ou suivra le diagnostic direct.

Mise en œuvre du diagnostic immunologique : il sera exclusif en début et en fin de maladie mais est également possible pendant toute la phase d'état :

- en début : absence d'extériorisation des parasites sanguins encore immatures. La sérologie se positive à partir du premier mois postinfestation ;
- en fin : après plus de 5 ans d'évolution, la raréfaction des pontes, consécutive à l'apparition de phénomènes immunitaires, diminue l'efficacité du diagnostic parasitologique direct.

Les réactions immunologiques utilisent les antigènes homologues solubles (extraits de *Schistosoma mansoni* entretenu au laboratoire sur le couple rongeur-planorbe) ou figurés (coupes de vers eux-mêmes) :

- les antigènes solubles : pour l'immunoélectrophorèse (avec mise en évidence de l'arc 4, signe de schistosomiase, et de l'arc 8, spécifique de l'espèce *mansoni*), l'immunoélectrosynérèse, l'hémagglutination passive et l'Elisa ;
- les antigènes figurés : pour l'immunofluorescence indirecte.

Des kits commerciaux existent et utilisent l'hémagglutination indirecte ou l'électrosynérèse avec un antigène spécifique.

Note : des antigènes figurés vivants, d'obtention extemporanée facile en pays d'endémie (œufs frais d'origine humaine, furcocercaires de planorbes trouvées naturellement infestées, miracidiums éclos), sont engagés dans des réactions immunologiques simples (COPT avec les œufs, CHR avec les furcocercaires, MIT avec les miracidiums libres issus des œufs).

La recherche d'antigènes circulants dans le sérum des sujets parasités est possible en utilisant un test Elisa mais elle est peu développée et serait surtout utile en séro-épidémiologie.

Mise en œuvre du diagnostic direct à la phase d'état. La pathologie est liée à la migration tissulaire rectale des œufs et à leur libération. Le diagnostic parasitologique est facile à ce stade si les œufs sont assez nombreux. Les œufs sont recherchés dans les selles à l'examen direct et après mise en œuvre d'une technique de concentration (Janeckso et Urbanyi par exemple) ; en région d'endémie, la technique de Kato – Katz est facile et très utilisée.

L'œuf de *Schistosoma mansoni* a une coque mince et incolore ; il est ovalaire, muni d'un grand éperon latéral bien formé et mesure entre 120 et 150 µm sur 60 µm, on y distingue à frais le miracidium. Certains œufs libérés tardivement peuvent être morts et calcifiés, ils sont plus sombres mais restent néanmoins reconnaissables à leur silhouette. L'émission des œufs est irrégulière du fait de leur mode aléatoire d'extériorisation par franchissement de la muqueuse rectale.

En cas d'examens répétés négatifs et d'une sérologie positive, la biopsie rectale sera un bon moyen de confirmation du diagnostic. Elle se pratique sous contrôle visuel au cours d'une rectoscopie. Le prélèvement de muqueuse est examiné à frais par simple écrasement entre deux lames de verre.

L'examen microscopique met en évidence la silhouette caractéristique des œufs tissulaires.

L'observation des œufs permet un diagnostic de certitude en précisant l'espèce de schistosome ; alors que lors du sérodiagnostic, il faut tenir compte d'éventuelles réactions croisées entre trématodes.

Note : Lors des examens anatomopathologiques de pièces d'exérèse chirurgicale, les tranches d'œufs de schistosomes peuvent être identifiées sur coupes histologiques par leurs affinités tinctoriales : l'œuf de *Schistosoma mansoni* est Ziehl + comme l'œuf de *Schistosoma intercalatum*, alors que l'œuf de *Schistosoma hæmatobium* est Ziehl –.

• Thérapeutique

Schistosoma mansoni est sensible à l'oxamniquine (Vansil®) dont il est la seule indication (prise unique entre 10 et 15 mg/kg), et au praziquantel (Biltricide®) en prise unique (40 mg/kg), avec une efficacité de l'ordre de 90 %.

Le contrôle parasitologique de la thérapeutique doit tenir compte du délai de migration des œufs dans la muqueuse car la négativation du diagnostic direct n'est effective que 2 mois au moins après le traitement. La négativation de la sérologie demande une année en absence de réinfestation.
Les complications graves, en particulier hépatospléniques (hypertension portale...), sont éventuellement justiciables d'un traitement chirurgical correcteur.

• Prophylaxie
La rupture de la chaîne épidémiologique suppose :
- le dépistage et le traitement systématique et périodique des porteurs (mise en œuvre de la technique de dépistage de Kato – examen coprologique simplifié mais efficace – et cure de praziquantel par exemple) ;
- la lutte contre le mollusque hôte intermédiaire par des molluscocides (niclosamide par exemple) ou une modification de son habitat (assèchement temporaire des mares, irrigation sous tuyau, etc.). Le coût de ces mesures les rend difficilement applicables à grande échelle. Parallèlement, l'éducation sanitaire (information des populations concernées, promotion de l'hygiène fécale) est indispensable. Des travaux actuels visent au développement de vaccins, en particulier par l'utilisation d'une protéine recombinante (Sm28GST). Actuellement, en l'absence d'un vaccin qui assurerait une protection durable contre les schistosomoses et en absence de chimioprophylaxie, l'homme sain se rendant en pays d'endémie devra s'interdire tout contact de la peau nue avec l'eau suspecte des mares et étangs d'eau calme.

II. Embranchement des Némathelminthes

Pour respecter le cadre de la question d'Internat, seule sera envisagée la classe des Nématodes, et à l'intérieur de celle-ci, des espèces responsables de pathologies intestinales (oxyure et anguillule).

Classe des Nématodes

A. Caractères généraux

Les nématodes ou vers ronds présentent à l'état larvaire et adulte un corps cylindrique, plus ou moins effilé aux extrémités, un tégument ferme, souple et résistant, de consistance chitinoïde, et une cavité générale, ou pseudo-célome, remplie de liquide. Les sexes sont séparés et la fécondation interne exige l'accouplement des sexes. Le développement des individus a lieu sans métamorphose, mais avec un nombre réduit (4) de mues de croissance. Les larves sont incapables de se multiplier par bourgeonnement. Les formes adultes parasites chez l'homme ne se multiplient jamais *in situ* ; un nombre élevé de parasites résulte en conséquence soit d'une infection multiple, soit de surinfestations successives. Seule fait exception à cette règle l'anguillule stercorale sujette à un cycle endogène.

1. Caractères morphologiques

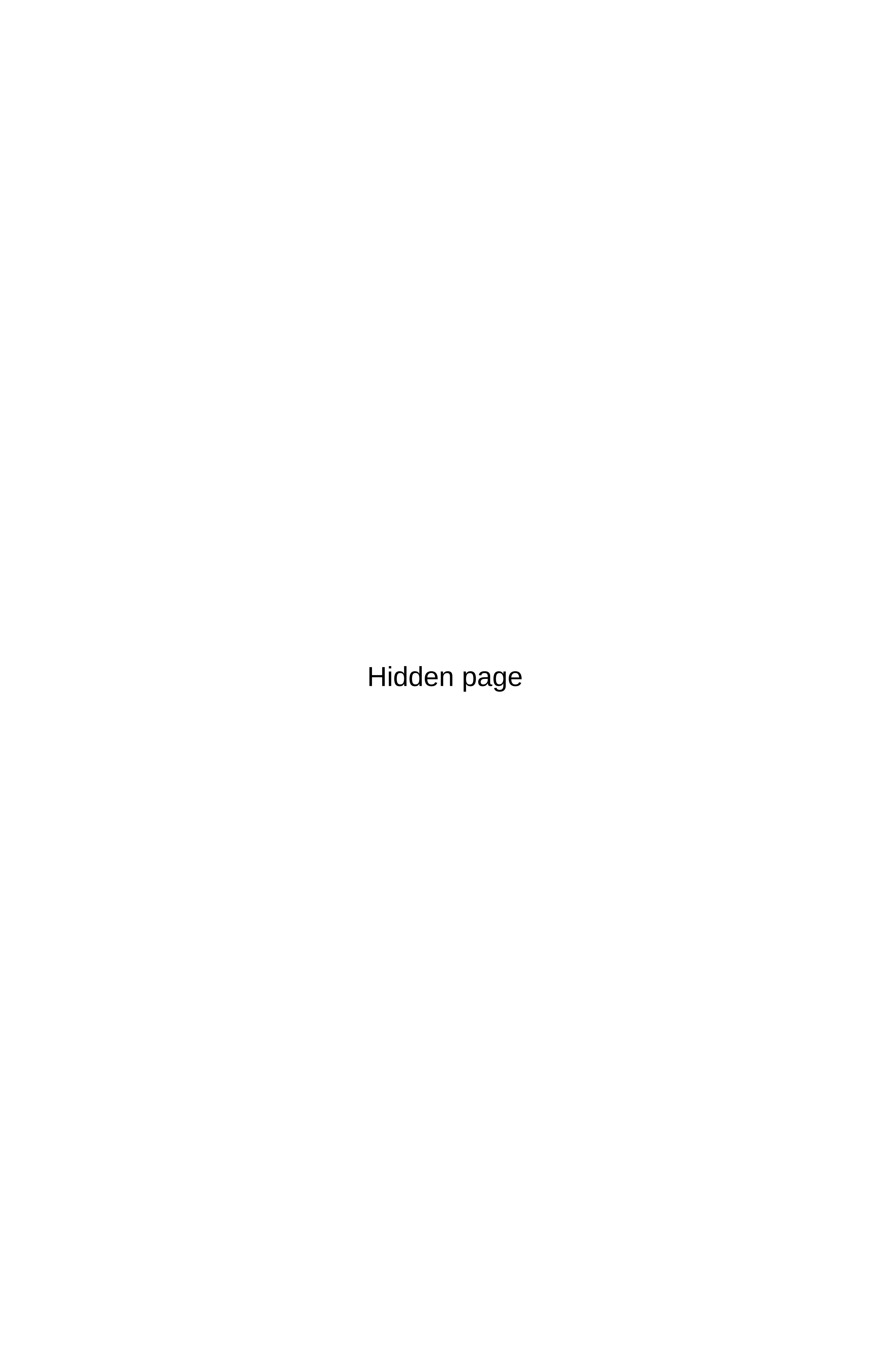
Les nématodes ne possèdent pas d'organes de fixation spécialisés à l'image des plathelminthes. Leur corps n'est pas segmenté, mais continu.
Leurs organes internes comportent, entre autres :

- un système locomoteur sous-tégumentaire leur conférant une grande mobilité ; un système nerveux et un système excréteur peu perceptibles. La disposition des cellules musculaires est caractéristique de chaque type de nématode. Les principales espèces parasites de l'homme pourront donc être identifiées sur coupes histologiques ;
- un système digestif complet formé d'un tube digestif ouvert aux deux extrémités du corps, et comportant après la bouche un œsophage musculeux. L'œsophage ou pharynx est facile à observer, il a l'aspect d'un tube à parois musculeuses. Il est qualifié de rhabditoïde s'il présente un double renflement (1 bulbe terminal et 1 bulbe subterminal), et de strongyloïde s'il présente un seul renflement terminal. L'intestin qui lui fait suite aboutit dans le cloaque qui s'ouvre en position subterminale. Les nématodes s'alimentent soit de sang puisé dans la muqueuse, soit du chyle intestinal, soit des liquides interstitiels dans le cas de parasites tissulaires et non luminaux ;
- un système reproducteur différencié selon le sexe, mâle ou femelle, sous forme de longs tubes rectilignes dont l'extrémité aveugle constitue la gonade, tandis que le reste du tube plus évasé correspond aux voies génitales et débouche au niveau des orifices génitaux.
  Chez les mâles, le testicule est suivi d'un canal déférent et aboutit au cloaque. Chez les femelles, il y a généralement 2 tubes comprenant chacun ovaire, oviducte et utérus. Les deux utérus se réunissent en un vagin unique qui débouche par l'orifice vulvaire. La vulve et l'orifice vulvaire sont distincts de l'orifice cloacal et plus antérieurs. L'utérus des femelles contient un nombre d'œufs plus ou moins élevé selon la taille corporelle de l'espèce. La ponte est continue, mais subit souvent des fluctuations dans le temps.

2. Caractères épidémiologiques

Les nématodes parasites du tube digestif chez l'homme sont tous monoxènes. La plupart des espèces sont spécifiques de l'espèce humaine qui constitue par conséquent son propre réservoir de parasites. Toutes les espèces sont cosmopolites mais certaines, exigeantes du point de vue température pour la survie de leurs larves présentes dans le milieu extérieur, n'existent à l'état endémique que dans les pays méditerranéens ou intertropicaux.
L'infestation de l'homme a lieu de diverses façons selon l'espèce de nématode considérée et sa biologie.
On peut citer des infestations :

- par ingestion d'un œuf embryonné (oxyure) ;
- par pénétration transcutanée active d'une larve du stade strongyloïde (ankylostome, nécator, anguillule). Une fois dans l'organisme humain, les larves se développent en accomplissant généralement des migrations internes simples ou complexes, obligatoires lorsqu'elles existent et au terme desquelles le ver deviendra adulte dans l'intestin de son hôte.


Hidden page

C'est donc un symptôme facilitateur adapté et favorable à l'accomplissement du cycle évolutif du parasite et à l'entretien de la parasitose. Les infestations plus massives seront à l'origine de l'« oxyurose maladie », constituée de troubles digestifs aspécifiques, de troubles nerveux (insomnies, irritabilité, agitation) et de troubles de la sphère génitale chez les filles (vulvites) dus à la migration des femelles gestantes ou consécutifs à des lésions de grattage surinfectées. Les femelles s'égarent parfois plus avant dans le tractus génital interne féminin, mais sans grand dommage, semble-t-il.
L'oxyurose appendiculaire, fréquente chez l'enfant, est accusée d'être à l'origine de syndromes appendiculaires et, plus rarement, d'appendicites vraies ; ces syndromes sont consécutifs à la localisation intraluminale ou intrapariétale dans l'appendice d'un contingent de 1 à 100 vers à divers stades de leur maturité.
Il n'y a pas d'immunité acquise avec l'oxyurose.

5. Diagnostic biologique

a) Diagnostic direct

Le diagnostic de l'oxyurose est toujours un diagnostic direct. La coproscopie est inopérante, les œufs étant émis en dehors des selles. Pratiquer le matin, avant la toilette, un prélèvement anal au papier cristal adhésif (*scotch test*, technique de Graham). L'examen au microscope met en évidence les œufs caractéristiques du parasite : incolores, asymétriques, à coque semi-épaisse, lisse, de 50 × 30 μm, et embryonnés.
Remarque : un seul prélèvement en période de prurit anal permet de diagnostiquer 50 % des oxyuroses ; 3 prélèvements répartis sur une semaine porteront ce pourcentage entre 80 et 90 % par la prise en compte des jours sans ponte.
Mise en évidence des femelles adultes : la recherche des parasites adultes femelles en surface des selles est possible mais aléatoire en dehors des infestations massives. Les mâles, trop ténus, sont peu visibles. En revanche, lors du prurit vespéral occasionné par les pontes, des femelles peuvent être détectées dans les plis périanaux.
Examens paracliniques d'orientation : taux d'éosinophiles sanguins modérément augmenté (entre 10 et 20 %) soit environ 1 G/L.

b) Diagnostic indirect immunologique

Aucun test n'est utilisable pour le diagnostic de l'oxyurose.

6. Thérapeutique

Elle est aisée. Mais les réinfestations sont inévitables en milieu contaminé car l'helminthose ne paraît pas immuniser. Le rythme de la réapparition des troubles cliniques règle celui des cures anthelminthiques.
On administre le pyrivinium (Povanyl®), le pyrantel (Combantrin®), le flubendazole (Fluvermal®). Les antioxyures sont administrés en prise unique. Leur efficacité varie entre 80 et 90 %. Il est recommandé de traiter simultanément tous les membres de la famille ou de la communauté.
Il est recommandé un traitement de consolidation à 15 jours du premier pour agir sur les larves éventuellement présentes lors du premier traitement et insensibles alors à la médication.

bassin méditerranéen. La chronicité de l'affection humaine renouvelle le stock de larves infestantes d'une saison estivale à l'autre, en dépit des rigueurs de l'hiver qui stérilise les sols.
En France, l'anguillulose est représentée, sauf exception, par des cas d'importation. Quelques cas de contamination en eau de piscine ont été décrits. La larve strongyloïde du sol est rapidement détruite par anaérobiose, insolation, les sols acides et les antiseptiques.

4. Rôle pathogène

Existence de porteurs asymptomatiques qui jouent le rôle de réservoir du parasite. La période d'invasion du parasite, rarement objectivée, ressemble à celle de l'ankylostomose, les migrations larvaires étant identiques.
À la période d'état (débutant entre 20 et 30 jours après l'infestation), la pénétration intramuqueuse des femelles conduit à :
- de la douleur abdominale, des nausées, et évoque parfois l'ulcère duodénal ;
- des troubles du transit (diarrhée alternant avec constipation) et de l'absorption des nutriments ;
- des troubles allergiques survenant par crise (urticaire, prurit, ou dermatite linéaire mobile principalement abdominale – *larva currens*) très prurigineuse, dont l'étiologie est discutée (anguillules d'origines animales ou migrations sous-cutanées de larves issues du cycle endogène) ;
- des troubles neurologiques (dépression).

Le pronostic de l'affection est aggravé par son passage à la chronicité même en l'absence de réinfestation exogène sur le terrain. En l'absence de thérapeutique spécifique, 80 % des malades font remonter leurs premiers symptômes à 5 ans ; 10 % entre 5 et 10 ans, et 6 % à plus de 10 ans.
L'immunodépression spontanée ou provoquée chez un porteur asymptomatique non dépisté est capable d'entraîner l'envahissement généralisé des viscères par les larves du parasite, à la suite de l'emballement des cycles endogènes ; ce dernier est consécutif à la non-destruction des larves rhabditoïdes des tissus par le système de défense immunitaire du sujet (pseudo-hypervirulence du parasite). Cette complication de l'anguillulose peut être mortelle ; elle est assez fréquente chez les sujets parasités présentant un syndrome d'immunodéficience acquise.

5. Diagnostic biologique

Il est indispensable pour confirmer un diagnostic clinique non étayé par les symptômes peu spécifiques de l'affection.

Diagnostic direct

Examen coproscopique. Recherche des larves rhabditoïdes mobiles de longueur comprise entre 200 et 300 µm dans les selles fraîchement émises du malade. Absence d'œufs du parasite (pondus et éclos dans les tissus), la faible quantité et l'irrégularité de l'extériorisation des larves L_1 imposent l'utilisation de méthodes de concentration et la multiplication des examens.
- Application d'une méthode de concentration des larves par filtration appropriée (méthode de Baermann) à 39 ou 40 °C ou par une méthode de concentration diphasique classique ;

- Mise en œuvre d'une méthode d'enrichissement (coproculture parasitologique comme pour le diagnostic de l'ankylostomose). Elle reproduit *in vitro* en quelques jours le cycle hétérogonique du parasite, fournissant des adultes mâles et femelles. Leurs pontes multiplient les larves L_3 observables qui se révèlent dans l'eau de la culture par leur mobilité permanente et leur nombre, à partir du 7ᵉ jour ;
- L'identification des larves L_1 se fait sur l'œsophage rhabditoïde, la taille comprise entre 200 µm et 300 µm environ et une ébauche génitale nette ;
- Les larves L_3 ont un œsophage strongyloïde occupant la moitié antérieure du corps, une taille d'environ 550 µm pour un diamètre de 16 µm et une extrémité postérieure légèrement bifide ;
- Les mâles et les femelles découverts dans la coproculture ressemblent à des oxyures dont la taille est voisine de 1 mm ;
- Dans les régions chaudes d'endémie d'anguillulose sévissent également les ankylostomes et les schistosomes. Il faudra donc faire un diagnostic différentiel. Les ankylostomes sont plus prolifiques que les anguillules et leur abondance relative peut cacher les rares anguillules ;

  Rappelons les principales différences :

	Strongyloïdes stercoralis	Ankylostome
J0 = émission des fèces	Larves L_1 rhabditoïdes, entre 200 et 300 µm Grande ébauche génitale	Œuf entre 60 et 70 µm
J1 à température ambiante	Larves L_2 rhabditoïdes, 400 µm	Larves L_1 rhabditoïdes, 250 µm Ébauche génitale courte
Coproculture à J7	Mâles et femelles (1 mm) Œufs (70 µm) Larves L_3 strongyloïdes, 550 µm Œsophage 1/2 du corps	Larves L_3 strongyloïdes, 600 µm Gaine (mue) Œsophage 1/4 du corps
Coproculture à J15	Plus de parasites vivants	Larves L_3 strongyloïdes

- Une espèce voisine, *Strongyloïdes fuelleborni,* peut parasiter l'homme en Afrique tropicale (une sous-espèce existe en Papouasie-Nouvelle-Guinée) ;
- Dans les mêmes conditions de diagnostic direct, *Strongyloïdes fuelleborni* pourra être trouvée sous forme d'œufs de petite taille dans les selles (50 µm), la larve L_1 qui éclôt après quelques heures est indiscernable de la larve de *Strongyloïdes stercoralis*, mais la L_3 est légèrement plus grande (600 µm).

Diagnostic indirect

La recherche des anticorps sériques est parfois nécessaire lors des infestations anciennes où l'émission des larves est rare ou suspendue dans l'intervalle des crises. Il s'agit de confronter les résultats de la séro-immunologie au bilan parasitologique du malade (réactions croisées fréquentes avec les nématodoses intestinales ou tissulaires).

Ce mode de diagnostic ne peut être envisagé chez les sujets immunodéprimés.

Diagnostic d'orientation

L'hématologie met en évidence une éosinophilie, parfois très élevée, évoluant par crises lors du renouvellement des périodes d'auto-infestation endogène. On observe alors des poussées d'éosinophilie modérées ou fortes (entre 30 et 40 %), parfois intenses (entre 50 et 70 %), suivies de retours plus ou moins prolongés à des taux faibles (entre 10 et 15 %).

6. Thérapeutique

- Difficile, le parasite étant résistant à de nombreux anthelminthiques. Depuis 1960, le traitement de référence était le tiabendazole (Mintézol®) qui se révèle actif dans trois quarts des cas environ. Il y a donc lieu de répéter la cure à J + 21 et de contrôler son efficacité (coproscopie et formule sanguine) ;
- L'ivermectine (Stromectol®) est très efficace avec une seule prise de 200 µm/kg ;
- Les contrôles post-thérapeutiques (coproscopie et examen hématologique) doivent être réalisés 1 mois, 6 mois et 1 an après le traitement. La réapparition d'une hyperéosinophilie sanguine en l'absence d'autre cause est souvent la preuve de la persistance du parasite ;
- Dans le cas d'un patient immunodéprimé, il peut être nécessaire de répéter le traitement plusieurs mois de suite. Une surveillance très attentive doit être exercée.

7. Prophylaxie

- Ses principes généraux sont les mêmes que ceux de l'ankylostomose mis à part le traitement de masse non réalisable sans surveillance médicale des sujets traités.
- L'ivermectine peut être la meilleure solution. Une prophylaxie particulière s'adresse aux sujets susceptibles de présenter une immunodépression (corticothérapie, traitement avant greffe).
- S'ils ont été en conditions contaminantes, les examens parasitologiques des selles doivent être répétés.
- En cas de résultat positif, l'efficacité du traitement devra être prouvée avant l'instauration de la thérapeutique immunosuppressive. En cas de résultat douteux ou si le sujet est déjà immunodéprimé, un traitement prophylactique contre l'anguillulose sera préconisé et répété chaque mois.

L'essentiel de la question

Tænia saginata

Tænia saginata est de la branche des Plathelminthes, cestode de l'ordre des Cyclophyllidés qui évolue alternativement dans l'intestin grêle de l'homme (HD) sous sa forme adulte et dans les muscles du bœuf (HI), sous la forme d'une larve appelée cysticerque.

- La contamination de l'homme
  Elle se fait par ingestion de larves vivantes avec la viande bovine crue, la contamination du bœuf se fait par ingestion d'œufs dispersés à partir des anneaux expulsés par l'homme ;

- *Cycle évolutif*
  L'hôte de *Strongyloïdes stercoralis* est l'homme ainsi que quelques espèces de mammifères dont le chien. La femelle pond dans la muqueuse intestinale, les larves L_1 sont extériorisées avec les selles. Sur le sol, selon les conditions climatiques, deux possibilités : soit un cycle homogonique qui produit des larves L_3 strongyloïdes infectieuses, soit un cycle hétérogonique qui produit des adultes libres mâles et femelles qualifiés de stercoraux qui, par reproduction sexuée, donneront en quelques jours des larves L_3 strongyloïdes infectieuses ;
  La contamination de l'homme sain se fait par pénétration transcutanée des larves L_3 suivie d'une migration par voie sanguine vers les poumons, déglutition et installation au début de l'intestin grêle. Le stade adulte parasitaire est obtenu au bout d'un mois et la longévité des adultes est de l'ordre de 3 mois ;
  Un cycle endogène est rendu possible par la maturation intestinale des larves L_1 qui deviennent des larves L_3 infectieuses au niveau du rectum ; cela explique les anguilluloses de longue durée chez des sujets sans possibilité de réinfestations ;
- *Épidémiologie*
  Les exigences de température et d'humidité des larves entraînent la localisation essentiellement tropicale de la strongyloïdose, mais la transmission est possible en région tempérée. C'est une maladie liée au péril fécal. L'espèce *Strongyloïdes fuelleborni* est localisée en Afrique, une sous-espèce est rencontrée en Papouasie-Nouvelle-Guinée ;
- *Rôle pathogène*
  Phase d'invasion discrète (dermatite, toux et hyperéosinophilie), puis phase d'état caractérisée par des troubles du transit (diarrhées intermittentes) et des douleurs abdominales. Des signes cutanés localisés, prurit et éruptions urticariennes durant quelques jours, se produisent irrégulièrement et signent les réinfestations endogènes.
  Ces signes sont connus sous le nom de *larva currens* et s'accompagnent d'une ascension de la courbe d'hyperéosinophilie sanguine. Une anguillulose disséminée maligne est possible chez les patients immunodéprimés (principalement sous corticothérapie) et illustre le caractère opportuniste du parasite ;
- *Diagnostic*
  Signe d'orientation : courbe d'hyperéosinophilie avec oscillations. Diagnostic direct de la strongyloïdose à *Strongyloïdes stercoralis* : recherche des larves L_1 dans les selles (rhabditoïdes, 200 µm). La technique de Baerman permet une concentration en cas de larves peu abondantes. Dans une coproculture, on pourra observer en 1 semaine des vers adultes mâles et femelles (rhabditoïdes, mobiles, environ 1 mm), des œufs (60 × 40 µm, aspect des œufs d'ankylostomes) des larves L_3 (strongyloïdes, 550 µm, œsophage égal à la moitié du corps, pas de gaine). Dans le cas de l'espèce *Strongyloïdes fuelleborni,* des œufs (50 × 35 µm, embryonnés) sont trouvés dans les selles, ils donnent les larves L_1 au bout de quelques heures.
  La superposition des zones d'endémie impose un diagnostic différentiel avec les larves L_3 d'ankylostomes (strongyloïdes, 600 µm, œsophage égal à un quart du corps et présence d'une gaine), leur longévité dans une coproculture est plus importante ;
- *Traitement*
  Les molécules efficaces sont le tiabendazole (Mintézol®) et l'ivermectine (Stromectol®). Chez le patient immunocompétent, le traitement par le tiabendazole

dure entre 3 et 4 jours, mais on tend à lui préférer l'ivermectine dont la dose unique est mieux supportée. Les examens de contrôle doivent être répétés après 1 mois, 6 mois et 12 mois. Chez le patient immunodéprimé, répéter le traitement chaque mois pendant 6 mois sachant que l'efficacité thérapeutique sera plus faible ;

- Prophylaxie
  En région de transmission, elle comporte la lutte contre le péril fécal et le conseil d'éviter le contact de la peau nue avec le sol, potentiellement contaminé par les matières fécales. Chez les sujets immunodéprimés ou devant subir une immunodépression préalable à une transplantation, il convient de dépister une anguillulose si le sujet a été en position de contamination. En cas de doute ou de positivité, le traitement spécifique est à instaurer et à répéter chaque mois.

Pour en savoir plus

Tænia saginata
- Bouree P. Cestodoses adultes. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris). Maladies infectieuses. Éditions Techniques. 1995 : 8-510-A-10.
- Nozais J.-P., Datry A., Danis M. *Traité de parasitologie médicale*. Pradel, Paris ; 1996 : 547-59.

Fasciola hepatica
- Becq-Giraudon B., Roblot F., Roblot P., Texereau M. Distomatoses. Encycl Med Chir. (Elsevier Paris). Maladies infectieuses. 1997 : 8-512-A-10.
- Nozais J.-P., Datry A., Danis M. *Traité de parasitologie médicale*. Pradel, Paris ; 1996 : 651-70.

Schistosomes
- De Gentile L., Cimon B., Chabasse D. Schistosomoses. Encycl Med Chir. (Paris Elsevier) Maladies infectieuses. 1996 : 8-513-A-10.
- Nozais J.-P., Datry A., Danis M. *Traité de parasitologie médicale*. Pradel, Paris ; 1996 : 727-77.

Enterobius vermicularis
- Poirriez J. Oxyures et oxyuroses. Encycl Med Chir. (Paris Elsevier) Éditions Techniques. Maladies infectieuses. 1993 : 8-515-A-20.
- Nozais J.-P., Datry A., Danis M. *Traité de parasitologie médicale*. Pradel, Paris ; 1996 : 429-35.

Strongyloïdes stercoralis
- Poirriez J., Justine J.-L., Le Pape P. Anguillules et anguilluloses. Encycl Med Chir. (Paris Elsevier) Éditions Techniques. Maladies infectieuses. 1994 : 8-514-A-60.
- Nozais J.-P., Datry A., Danis M. *Traité de parasitologie médicale*. Pradel, Paris ; 1996 : 451-57.


Hidden page

Toxoplasmose

M.-H. BESSIÈRES, Laboratoire de Parasitologie, Mycologie,
Hôpital Rangueil, CHU Toulouse.

La toxoplasmose est une anthropozoonose ubiquitaire, très répandue, due à Toxoplasma gondii (T. gondii), protozoaire appartenant au Phylum Apicomplexa. Il appartient à la classe des Sporozoea, sous-classe Coccidia, à l'ordre des Eucoccidies, à la famille des Sarcocystidae (Levine 1988). En 1908, Nicolle et Manceau découvrent, à l'Institut Pasteur de Tunis, le parasite chez un rongeur sauvage du Sud tunisien, Ctenodactylus gondii. Ce protozoaire endocellulaire en forme de croissant est dénommé T. gondii. Il détermine chez son hôte en captivité une maladie dont l'issue est fatale. Le premier cas humain de toxoplasmose congénitale est décrit en 1923 par Janky, ophtalmologue tchèque. Il met en évidence, post mortem, chez un enfant hydrocéphale au niveau de la rétine, sur des coupes histologiques, des kystes contenant de nombreux parasites. Ce cas passe inaperçu. En 1937, Wolf et Cowen décrivent l'encéphalite néonatale d'origine toxoplasmique, de transmission intra-utérine. Dans les années qui suivirent, d'autres cas cliniques de toxoplasmose furent décrits. En 1941, Sabin décrit une encéphalite d'origine toxoplasmique chez un enfant et effectue, en 1942, une première revue générale sur les manifestations cliniques. En 1948, Sabin et Feldman décrivent un test sérologique, le dye test ou test de lyse, et en 1957, Goldman met au point l'immunofluorescence microscopique pour explorer l'immunité humorale chez l'homme. Le développement de ces tests a permis d'évaluer l'incidence de cette maladie et de montrer que la toxoplasmose est très répandue chez l'homme et l'animal. De nombreuses manifestations pathologiques ont alors pu lui être rapportées. En 1970, Frenkel et ses collaborateurs décrivent le cycle sexué du parasite chez le chat après la mise en évidence par Hutchison du parasite dans les fèces du chat (56, 70, 83).

I. Agent pathogène *Toxoplasma gondii*

A. Morphologie

Toxoplasma gondii est une coccidie à développement intracellulaire obligatoire (57, 63, 109).
Il réalise son développement de chat à chat, d'hôte intermédiaire à hôte intermédiaire ou du chat à un hôte intermédiaire. La transmission du toxoplasme se fait par les tachyzoïtes, les bradyzoïtes enkystés ou bien par les sporozoïtes contenus dans les oocystes (*fig. 1*).

1. Tachyzoïte

C'est une forme de multiplication rapide du parasite correspondant à la partie du cycle asexué. Il mesure 6 à 8 µm de long sur 2 à 4 µm de large, a une forme de croissant avec une extrémité antérieure effilée et l'extrémité postérieure arrondie. Il est susceptible de se mouvoir par ondulation mais n'a pas de structure locomotrice particulière. Il renferme des organites caractéristiques d'une cellule mais certains lui sont spécifiques. Comme tous les *Apicomplexa*, il possède un complexe apical situé dans la partie antérieure du tachyzoïte comprenant un conoïde, des rhoptries, des micronèmes et des granules denses. Le tachyzoïte pénètre en

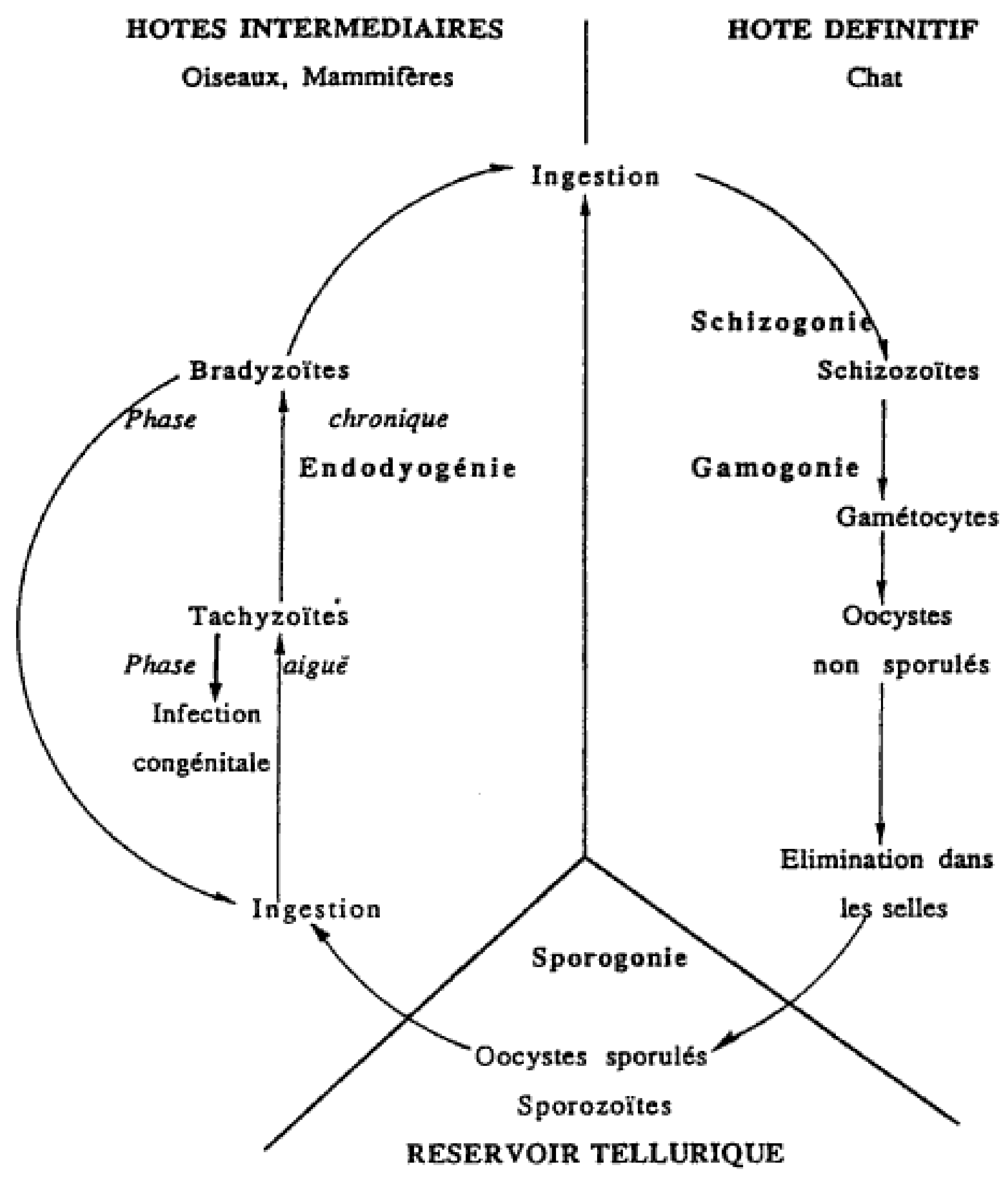


Figure 1. Cycle d'évolution de *Toxoplasma gondii*

15 secondes dans le macrophage par un phénomène actif, différent de la phagocytose. Le complexe apical est associé au passage à travers les membranes lors de la pénétration dans la cellule. Il se forme, très rapidement, une vacuole parasitophore autour du toxoplasme. Des substances présentes dans les rhoptries, les granules denses et les micronèmes, sont excrétées dans la vacuole parasitophore et créent un environnement favorable au développement du toxoplasme dans la cellule hôte. Le tachyzoïte se divise dans la cellule hôte par le processus d'endodyogénie. C'est une division binaire interne aboutissant à la formation de deux tachyzoïtes à l'intérieur de chaque parasite. Ce cycle dure de 5 à 10 heures selon la souche. Les

libèrent, après évagination cytoplasmique, les microgamètes. Le nombre de microgamètes varie de 12 à 32. L'oocyste qui résulte de la fécondation d'un microgamète et d'un macrogamète tombe dans la lumière intestinale et est éliminé, encore immature, avec les fèces du chat.
Dans le cas d'infection du chat par carnivorisme (ingestion des kystes) les oocystes sont relargués 5 à 6 jours après dans les fèces. Lors d'infection par ingestion d'oocystes, la période est plus longue, 20 à 40 jours.

b) Cycle asexué extra-intestinal

La prolifération asexuée des tachyzoïtes en dehors de l'intestin constitue le cycle extra-intestinal. À la *phase aiguë*, au début de l'infestation, les tachyzoïtes se déplacent par voie sanguine et lymphatique et envahissent très rapidement les cellules de l'hôte infesté (entre 15 et 40 secondes). À ce stade, les organelles spécifiques du toxoplasme permettent la pénétration dans la cellule. Par la combinaison de processus mécaniques et chimiques, le parasite peut pénétrer dans n'importe quelle cellule nucléée. Une membrane d'origine parasitaire et cellulaire se forme puis une vacuole parasitophore qui permet sa survie dans la cellule. Les tachyzoïtes inhibent la fusion de la vacuole parasitophore avec les lysosomes cellulaires et entament une multiplication asexuée par endodyogénie. Divers organes et en particulier rein, foie, poumon, muscle strié, système nerveux central, sont envahis.
Progressivement, les bradyzoïtes se différencient à l'intérieur de formations kystiques. Les premiers kystes apparaissent dans les 10 jours suivant l'infection. Ils se forment préférentiellement dans certains tissus : cerveau, muscles, œil. Les kystes ont une pérennité certaine et se maintiennent dans les tissus toute la vie de l'hôte. Il s'établit un équilibre entre les deux.
La forme coccidienne est propre au chat et est à l'origine de la reproduction sexuée du parasite que l'on ne retrouve pas chez l'hôte intermédiaire. Le même processus de multiplication asexuée est observé chez les hôtes intermédiaires.

2. Évolution dans le milieu extérieur : sporogonie

Les oocystes, non sporulés, sont excrétés par milliers dans les fèces du chat, plus ou moins rapidement en fonction du mode de contamination (5 à 40 jours après la primo-infection). Un seul et même chat répand dans son environnement des centaines de milliers, voire des millions d'oocystes. La durée d'excrétion est de 1 à 3 semaines. Ils sont résistants et peuvent être retrouvés dans le sol humide jusqu'à un an après l'émission par le chat. Ainsi, la probabilité de rentrer en contact avec des oocystes à proximité des lieux d'habitation est très élevée. Il a été décrit que des oocystes éliminés par des chats et des félidés sauvages ont contaminé des eaux de boisson à l'origine d'infection humaine (5).
La sporulation est plus ou moins rapide suivant les conditions climatiques. Elle a lieu entre le premier et le cinquième jour après l'excrétion si la température se situe entre 15 et 25 °C. Une température de 37 °C ou supérieure lui est défavorable Elle ne se produit pas à 4 °C. En revanche, les oocystes sporulés restent infestants après 12 à 18 mois à 4 °C. Ils sont viables après 28 jours à – 20 °C. Ils sont très résistants aux désinfectants usuels.

Au stade d'oocystes sporulés, le cycle de *T. gondii* peut se poursuivre selon deux voies : soit un chat s'infeste en ingérant les oocystes et le cycle sexué du parasite se renouvelle, soit des hôtes intermédiaires dont l'homme les ingèrent et le cycle de multiplication asexué se déroule.

3. Cycle asexué chez les hôtes intermédiaires

Ce fut jusqu'en 1970 la seule partie du cycle connue. Le développement de cette phase du cycle se déroule chez de nombreux animaux (oiseaux, mammifères y compris l'homme). L'infestation des hôtes intermédiaires se fait, chez les herbivores, par ingestion d'oocystes présents sur les végétaux, dans la terre ou l'eau souillée et chez les carnassiers par des kystes contenus dans la viande. La phase sexuée n'a pas lieu chez ces hôtes. Le toxoplasme se retrouve uniquement en localisation extra-intestinale. Après l'ingestion, les sporozoïtes ou les bradyzoïtes traversent l'épithélium intestinal. On observe tout d'abord la phase aiguë puis la phase chronique de l'infection telle qu'elle se déroule chez le chat.
Chez l'homme, la partie du cycle asexué se déroule de la même manière. Il constitue un cul-de-sac évolutif ne permettant pas de boucler le cycle évolutif du parasite. Chez la femme enceinte, l'infection en cours de grossesse peut par voie sanguine et transplacentaire induire une toxoplasmose congénitale.
Le cycle évolutif de *T. gondii* a la particularité de pouvoir suivre un cycle monoxène d'hôte intermédiaire à hôte intermédiaire sans infester un hôte définitif. Dans ce cas, le cycle se déroule sans reproduction sexuée.
Mode de contamination chez l'homme dans la toxoplasmose acquise : l'homme s'infeste le plus souvent par voie orale. La principale source d'infection est due à l'ingestion de kystes contenus dans la viande insuffisamment cuite. Elle est également possible par ingestion d'oocystes présents dans la terre ou sur les aliments. Le risque d'une contamination par la forme tachyzoïte par transfusion sanguine est très faible. En revanche, les contaminations suite à une transplantation d'organes ne sont pas rares.
Dans la toxoplasmose congénitale, c'est la forme tachyzoïte qui est infestante par voie sanguine pour le fœtus.
Les trois formes parasitaires, tachyzoïtes, bradyzoïtes, oocystes, peuvent donc être infestantes pour l'homme.
Concernant les souches de toxoplasmes isolées chez l'homme et chez l'animal, la variabilité de la pathogénicité et de la virulence chez la souris ainsi que la diversité des manifestations cliniques chez l'homme ont laissé supposer un polymorphisme génétique important de *T. gondii*. Cependant, l'analyse de marqueurs génétiques montre un faible degré de polymorphisme avec une appartenance des isolats à seulement trois groupes principaux. L'analyse des profils iso-enzymatiques a révélé l'existence de cinq zymodèmes majeurs. Tous les zymodèmes peuvent être impliqués dans la toxoplasmose congénitale. Des résultats similaires ont été obtenus par typage moléculaire des souches (1). Il reste difficile de corréler la sévérité clinique d'une toxoplasmose congénitale avec le génotype d'une souche donnée de *T. gondii* (38).

II. Situation épidémiologique

A. Répartition géographique et prévalence de l'infection humaine

La toxoplasmose est une maladie pandémique cosmopolite. 1/3 de la population mondiale est exposé à cette parasitose (122). La part de la population humaine atteinte de toxoplasmose est très variable suivant les régions. Les valeurs s'étalent entre 0 et 90 %. Aux Royaume-Uni, États-Unis et Australie, 30 % de la population est estimée atteinte (61) alors qu'en France, 54,3 % des femmes enceintes étaient immunisées en 1995 (3). En Afrique du Nord et en Afrique noire, le pourcentage d'adultes immunisés est dans plusieurs pays supérieur à 50 %. En Asie, il est plus faible.
Cette variabilité s'explique de plusieurs manières (61) :

- le climat : l'infection est plus commune dans les régions chaudes et de plaines qu'en altitude et dans les régions froides. Les facteurs climatiques influencent la survie et la sporulation des oocystes ;
- l'hygiène de vie : dans les pays en voie de développement, la prévalence est généralement élevée et l'acquisition d'une immunité est plus précoce que dans les pays occidentaux. La présence de félidés augmente la prévalence. En zone tropicale, la transmission par les oocystes est probablement prépondérante. Elle est directement liée à la pollution du sol par des excréments de félidés. D'une façon générale, la toxoplasmose semble plus fréquente dans les zones où les chats sont présents de longue date ;
- le régime alimentaire : les populations se nourrissant de viande crue ou saignante (exemple la France) ont des taux plus élevés que celles qui mangent de la viande cuite (Angleterre, Allemagne) ;
- l'âge : la prévalence augmente avec l'âge au sein d'une population.

Concernant l'épidémiologie de la toxoplasmose congénitale, chez une femme immunocompétente, l'infection du fœtus résulte du passage du toxoplasme sous la forme tachyzoïte de la mère à l'enfant par voie sanguine à travers le placenta. Elle ne peut intervenir que si la contamination de la mère s'est produite au cours de la grossesse. Ce risque existe pour les femmes enceintes non immunisées. Une enquête nationale, réalisée en France en 1995 par le Laboratoire national de la santé, a démontré chez elles une séroprévalence de 54,3 %. Une nouvelle enquête de 2003 du LNS a montré une baisse de la prévalence passant de 54,3 % à 44 % (2). Les résultats montrent une hétérogénéité dans la prévalence de l'immunité : le pourcentage des femmes présentant une sérologie positive s'étend suivant les régions de 34 à 70 %. En 1995, l'incidence de la toxoplasmose est de 6,6 cas pour 1 000 grossesses et plus précisément de 14,8 cas pour 1 000 femmes séronégatives en début de grossesse donc un risque de s'infecter en cours de grossesse de 1,5 % (3). Cela représente un nombre annuel de toxoplasmoses maternelles en cours de grossesse d'environ 5 000 si on évalue le nombre de grossesses annuelles proche de 750 000. La distribution de la séroprévalence par région d'habitation et par département permet de distinguer quatre grandes zones de prévalence, basse dans l'Est et le Centre-Est, faible ou moyenne dans tout le Centre-Ouest, supérieure à la moyenne dans le quart Nord-Ouest (Bassin parisien inclus) et le Sud. Des facteurs climatiques peuvent expliquer ces différences (3, 22).

La fréquence des toxoplasmoses congénitales a pu être estimée aux environs de 1 à 2 cas pour 1 000 naissances, ce qui représente environ 1 000 à 2 000 cas annuels de toxoplasmose en France (95).
De même, le risque de développer une toxoplasmose clinique est élevé chez les patients immunodéprimés du fait du fort taux d'immunisation de la population adulte. C'est une infection opportuniste majeure. Ainsi, en 1992, elle touchait 25 % des patients au cours de l'infection à VIH. La chimioprophylaxie par le cotrimoxazole et les traitements antirétroviraux ont réduit la fréquence de cette infection (87).

B. Prévalence animale

Les animaux jouent un rôle majeur dans le maintien du cycle. De nombreuses espèces animales, mouton, chèvre, porc, cheval, volaille, peuvent être infectées et cela sur les cinq continents. Les populations animales sont touchées à des degrés variables selon le climat, le mode de vie (domestique ou sauvage), l'alimentation et l'âge. Le mouton est une espèce particulièrement exposée. On dénombre de nombreux cas à l'origine d'avortements ou de morts fœtales chez la brebis. Cela entraîne des pertes économiques non négligeables pour les éleveurs (56, 122). La fréquence de la toxoplasmose chez le chat varie en fonction de son mode de vie. Des études épidémiologiques ont été réalisées dans des populations de chats. Les résultats sont très variables et peuvent s'expliquer par le test employé, la situation géographique, et les caractéristiques des échantillons de population étudiés (taille, mode de vie). En France, la séroprévalence se situe à plus de 50 % de la population adulte (63).

III. Clinique

A. Mécanismes immunitaires dans la toxoplasmose acquise et congénitale

Connaître la réponse immunitaire de l'hôte infecté est essentiel pour la compréhension de la maladie (10, 56, 70, 109).

1. Immunité humorale

Dans la toxoplasmose acquise, suite à la contamination, l'immunité humorale se met en place. Elle ne joue pas un rôle essentiel dans la résistance à l'infection. Les différents isotypes IgM, IgA, IgG et IgE apparaissent à la suite de l'infection. Les anticorps lysent les toxoplasmes extracellulaires en présence de complément alors que les formes intracellulaires ne sont pas affectées. La multiplication intracellulaire des toxoplasmes dans les macrophages, sans qu'intervienne la destruction du parasite, permet la dissémination du parasite dans l'organisme par voie sanguine et lymphatique à l'abri de l'effet lytique des anticorps. Les anticorps limitent donc la dissémination des parasites dans l'organisme mais sont insuffisants pour stopper

l'infection. Des études expérimentales ont montré qu'ils ne sont pas protecteurs puisque le transfert passif d'anticorps ne protège pas les souris contre l'infection. De plus, de nombreux essais d'immunisation par les toxoplasmes morts ou irradiés ainsi que par des extraits antigéniques entraînent la production d'anticorps sans pour autant apporter une protection contre ce parasite. Une immunité peut se développer chez des souris déficientes vis-à-vis de la synthèse des IgM (69).
Dans la toxoplasmose congénitale, l'immunité se met en place plus lentement. Conjointement au transfert passif des immunoglobulines maternelles, il existe une production d'immunoglobulines par le fœtus. Les IgG, tout au moins les sous-classes IgG1, IgG3, IgG4, traversent la barrière placentaire. Ce phénomène actif est lié à une structure particulière portée au niveau du fragment Fc des immunoglobulines appartenant à ces sous-classes. Les anticorps IgG sont détectés dès le troisième mois de la vie fœtale. Leur titre, fonction de la quantité des IgG maternelles, augmente progressivement au cours de la gestation pour atteindre et parfois dépasser à la naissance celui de la mère. Ces anticorps ont un effet protecteur très limité. Cependant, reçus passivement, ils ont à la fois une action sur le parasite et sur l'hôte. Ils lysent les toxoplasmes extracellulaires, favorisant la multiplication dans la cellule et leur enkystement mais surtout, ils peuvent induire chez le fœtus une tolérance spécifique. Il a été prouvé grâce aux prélèvements de sangs fœtaux que le fœtus est capable de répondre sur le plan immunitaire et de synthétiser ses propres anticorps (8, 9, 40, 80, 107). Dans la toxoplasmose congénitale, des anticorps appartenant à tous les isotypes sont retrouvés dans la circulation fœtale à partir de la vingtième semaine de gestation.

2. Immunité cellulaire

Le rôle de l'immunité à médiation cellulaire est essentiel dans la lutte contre l'infection, comme l'ont démontré de nombreux travaux. Ainsi, des souris nudes athymiques ne développent pas d'immunité protectrice tandis que le transfert de cellules spléniques et de nodules lymphatiques transfère une immunité spécifique vis-à-vis de *T. gondii* (70). En début d'infection, les toxoplasmes se multiplient à l'intérieur des macrophages et résistent à leur lyse en s'opposant à la fusion phagosome-lysosome. Une réponse immune cellulaire induite implique les macrophages, les cellules *natural killer* (NK), les cellules T et la production de cytokines associées. *T. gondii* peut directement stimuler les macrophages pour produire l'interleukine 12 (IL12) et le *tumor necrosis factor* α (TNF α). À la suite de l'activation des macrophages, ces cytokines agissent en synergie pour induire la production d'interféron γ (IFN γ) par les cellules NK, ce qui stimule l'activité microbicide des macrophages. Les mécanismes effecteurs de l'immunité impliquent les ions superoxydes, des dérivés nitrés et des produits du métabolisme de l'acide arachidonique. Ces événements agissent comme la première ligne de défense dans la résistance contre l'infection avant le développement de la réponse des lymphocytes T. La résistance au parasite implique à la fois des cellules T CD4+ et CD8+. Les cellules T helper 1 (Th1) CD4+ exercent leur effet protecteur à travers la production de cytokines pro-inflammatoires telles l'interféron γ et l'IL2. Inversement, les cytokines produites par les cellules Th2 CD4+ telles IL-4, IL-5 et IL-10, sont associées à la diminution de l'effet protecteur de l'immunité cellulaire. Les

cytokines type Th2 favorisent la multiplication intracellulaire du parasite. Cependant, elles sont nécessaires pour diminuer la réaction pro-inflammatoire. L'effet protecteur des cellules T CD8+ est également régulé par la production de cytokines (114). Nous avons pu montrer, dans un modèle de co-culture *in vitro*, l'effet synergique de l'IL4 et de l'IL10 produites par les lymphocytes sur la suppression des fonctions effectrices du macrophage et prouver que l'évolution de la maladie est dépendante d'un équilibre entre les cytokines Th1 et Th2 (12, 121). Un profil sérique Th2 est associé aux rebonds sérologiques observés fréquemment chez les enfants atteints de toxoplasmose congénitale (84).
Le développement de l'immunité limite l'infection mais n'est pas capable d'éradiquer le parasite lui permettant ainsi de proliférer au niveau des tissus nerveux et de la rétine. Les barrières hémato-méningée et hémato-oculaire limitent le flux des cellules immunocompétentes, des médiateurs, en particulier l'interféron γ et des anticorps. Les réactions inflammatoires observées au cours de l'infection, en particulier au niveau de la rétine, peuvent être associées à une réaction d'hypersensibilité.
Chez le sujet infecté par le VIH, la baisse de l'immunité avec diminution du taux des lymphocytes CD4 < 200/mm^3 favorise la réactivation des formes intrakystiques et la reprise de l'évolution de la maladie (87).

B. Physiopathologie

Quel que soit le mode de contamination, le parasite est disséminé dans l'organisme par les vaisseaux lymphatiques et sanguins (10, 63, 109). La première phase correspond à la phase de dissémination du parasite dans l'organisme. Les toxoplasmes pénètrent dans les cellules du système histiomonocytaire et s'y multiplient. Des parasites sont ensuite libérés dans les cellules et envahissent des cellules adjacentes. Ils diffusent ainsi dans tout l'organisme. Le foie est le premier organe atteint. Les toxoplasmes se multiplient dans les hépatocytes. Les tissus lymphoïdes, les poumons, le cerveau, le tissu musculaire, la rétine, sont ensuite le siège de la multiplication des parasites. Chez un sujet immunocompétent, cette phase de dissémination dure environ 1 à 2 semaines. C'est à ce stade que le toxoplasme peut se localiser dans le placenta. Au cours de la deuxième phase, les défenses immunitaires de l'hôte commencent à être effectives. Les tachyzoïtes libres se raréfient car ils sont lysés par les anticorps dès qu'ils sont libérés de la cellule infectée. En revanche, dans les organes pauvres en anticorps, le passage de cellule à cellule (œil, cerveau) se poursuit. Dans la troisième phase ou phase chronique, les bradyzoïtes demeurent intracellulaires à l'intérieur de formes kystiques. Ils continuent à s'y multiplier et puis entrent dans un état de quiescence qui peut durer de nombreuses années. Ces kystes se forment dans tous les tissus. Ils sont plus nombreux dans les tissus où la multiplication du parasite a été le plus longtemps tolérée (œil, système nerveux central). Ce phénomène est à l'origine des lésions observées dans l'infection congénitale. Ils sont également à l'origine de la reprise évolutive d'une toxoplasmose ancienne chez les patients immunodéprimés (VIH ou sujets sous traitement immunosuppresseur).
Dans la toxoplasmose congénitale, la première phase de dissémination peut se poursuivre plus longtemps car le système immunitaire est immature.

C. Tableaux cliniques

1. Toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent

Les formes asymptomatiques sont les plus fréquentes (dans plus de 80 % des cas). Elles sont dépistées par le diagnostic sérologique (4, 56, 109).

La forme clinique bénigne s'observe chez l'enfant, l'adolescent et l'adulte jeune. Elle associe des adénopathies, une fièvre et une asthénie et éventuellement des modifications de la formule leucocytaire. Les adénopathies sont découvertes soit fortuitement par le malade ou le médecin au cours d'un examen systématique, soit à l'occasion d'une altération discrète de l'état général. Elles sont mobiles, parfois sensibles à la palpation, rarement douloureuses. Elles sont de consistance ferme sans périadénite ni adhérence à la peau et aux plans profonds. Elles n'ont jamais un caractère inflammatoire et ne suppurent jamais. Leur persistance est longue, plusieurs mois, parfois même plus d'un an. Elles siègent en général dans la sphère cervicale, région occipitale, jugulo-carotidienne et trapézienne. Éventuellement la localisation est axillaire et inguinale. La fièvre est modérée, à 38 °C, mais inconstante. L'asthénie va persister plusieurs semaines quand elle est observée. Ces symptômes peuvent s'accompagner d'un exanthème, de myalgies et de céphalées. Au niveau sanguin, le nombre des hématies reste normal. Il existe dans environ 1/3 des cas un syndrome mononucléosique sanguin sans hyperleucocytose avec lymphocytose et cellules mononucléées à cytoplasme hyperbasophile en faible nombre (2 à 8 %). Cela fait de la toxoplasmose acquise une étiologie possible des « syndromes mononucléosiques ».

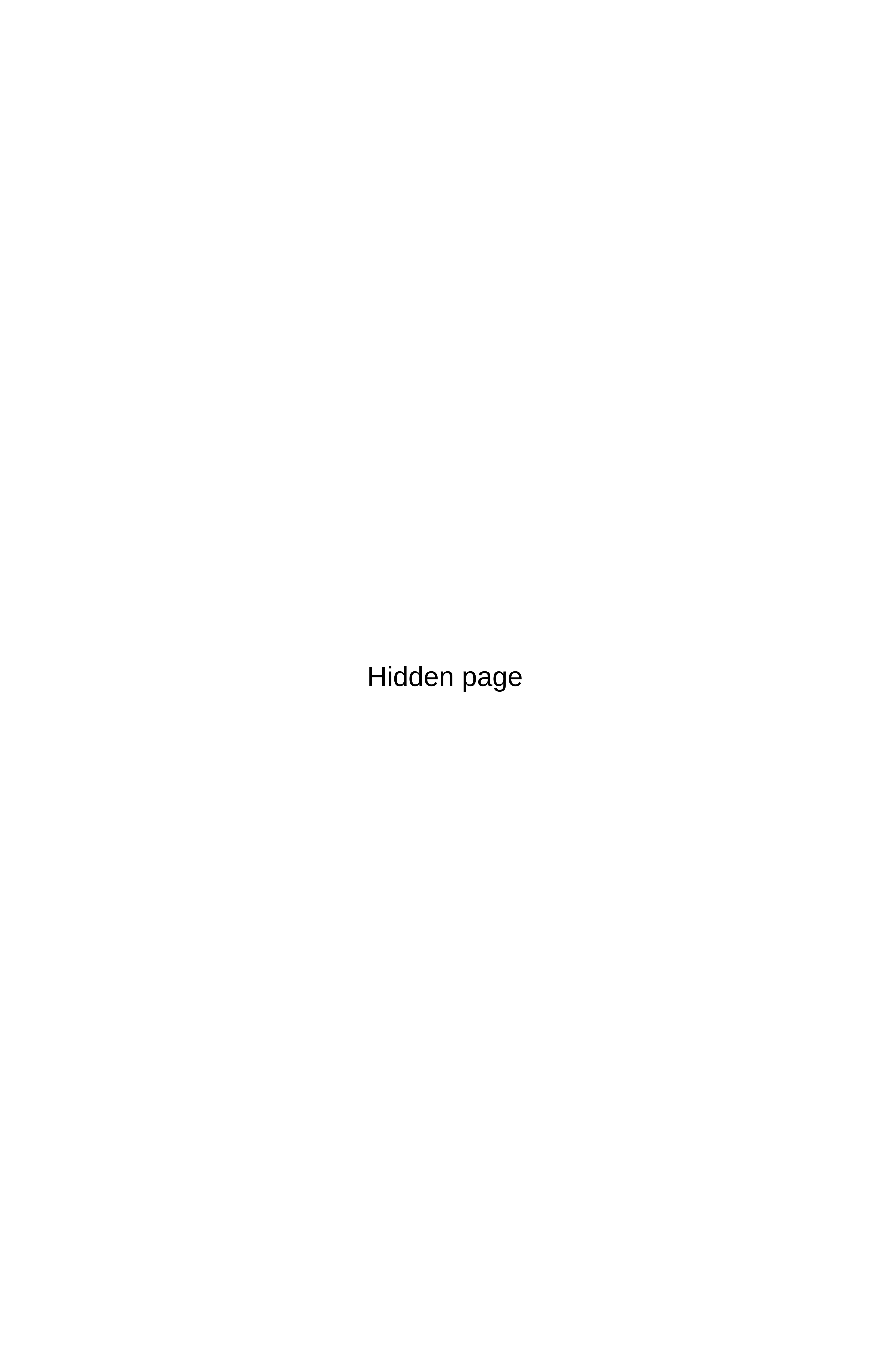
Les formes graves sont exceptionnelles chez le sujet immunocompétent. Des atteintes multiviscérales, myocardite, polyradiculonévrite, sont décrites. Des complications oculaires sont observées à la suite de toxoplasmose acquise (77, 100, 122). Des souches hypervirulentes ou une contamination massive peuvent en être à l'origine. Les réinfestations, chez les patients immunocompétents, sont habituellement asymptomatiques. Toutefois des réinfestations accidentelles avec signes cliniques ont été décrites (62).

La toxoplasmose acquise présente une gravité particulière lorsqu'elle survient chez la femme enceinte en raison du risque encouru par le fœtus. La présence d'adénopathies doit être recherchée lorsque les examens sérologiques évoquent une infection récente. Dans la majorité des cas, cette primo-infestation est asymptomatique.

2. Toxoplasmose acquise du sujet immunodéprimé

La toxoplasmose est une affection latente (87). Des changements du système immunitaire peuvent entraîner une réactivation de l'infection. Chez les femmes enceintes immunodéprimées, immunodépression acquise ou thérapeutique, des infections congénitales ont été décrites suite à une reprise évolutive d'une infection ancienne.

Les formes graves de la toxoplasmose acquise sont observées chez les patients immunodéprimés : immunodépression acquise (Sida), immunodépression thérapeutique (corticoïdes à forte dose, traitement immunosuppresseur en particulier chez les transplantés et greffés de moelle, patients atteints d'hémopathies malignes, cancers…).



Ces complications ont justifié l'obligation d'un dépistage sérologique obligatoire de la toxoplasmose des donneurs et receveurs de greffe pour connaître leur statut immunitaire avant la greffe (décret du 9/10/1997).

3. Toxoplasmose congénitale

La toxoplasmose congénitale est la conséquence d'une primo-infection de la femme enceinte. Plusieurs événements doivent survenir. La contamination maternelle doit se produire pendant la grossesse, le toxoplasme doit se localiser dans le placenta, enfin le parasite doit passer dans la circulation fœtale (51).
Lors d'une primo-infection toxoplasmique chez la mère en cours de grossesse, le toxoplasme n'est pas transmis dans tous les cas au fœtus, environ 1/3 des fœtus sont infectés (51). Le facteur essentiel est la date de l'infection maternelle pour déterminer la fréquence et la gravité de l'atteinte fœtale. La contamination placentaire est possible pendant la phase parasitémique de la mère. La transmission maternofœtale est rare au premier trimestre, augmente au deuxième, pour être fréquente au troisième trimestre. Ce fait a été prouvé par plusieurs études (8, 51, 82, 107) et confirmé en 1999 dans l'étude de Dunn *et al.* (59). Le risque de transmission fœtale se situe au minimum à 4 % pour des séroconversions maternelles du premier trimestre, à 25 % pour le deuxième trimestre et à plus de 50 % pour le troisième *(tab. 1)*. En retenant le taux de séroconversion maternelle de 6 pour 1 000 grossesses, valeur du LNS, et un risque de transmission de 25 à 34 % pour l'ensemble de la grossesse, on peut estimer la fréquence des toxoplasmoses congénitales proche de 2 cas pour 1 000 naissances soit environ 2 000 cas annuels.
Le toxoplasme, quand il se localise dans le placenta, induit la formation de microabcès qui vont secondairement passer la barrière fœto-placentaire et atteindre le fœtus. Le parasite présent dans le placenta y demeure jusqu'au terme de la grossesse alors que la parasitémie maternelle est brève. Il est donc une source potentielle d'infection pour le fœtus même après la disparition de la parasitémie maternelle. Un délai peut intervenir entre l'infection placentaire et la transmission fœtale. Il peut aller jusqu'à 3 mois. Si ce délai est long, le fœtus peut recevoir de façon passive des anticorps maternels. Ils ont un effet protecteur limité en détruisant les toxoplasmes extracellulaires mais favorisent l'enkystement. De plus, ils agissent sur l'immunisation du fœtus. La reconnaissance des antigènes par les cellules immunes fœtales et le développement de l'immunité du fœtus sont alors retardés. Une tolérance spécifique est induite qui ne cessera qu'après la disparition des anticorps maternels. La thérapeutique instituée plus ou moins rapidement intervient également dans la transmission maternofoetale. Le traitement par la spiramycine a augmenté la proportion d'enfants non infectés, 76 % chez les mères traitées et 39 % en l'absence de traitement (51).
Inversement, l'atteinte fœtale est d'autant plus sévère que la contamination maternelle est précoce. Ainsi, dans l'étude prospective de Desmonts et Couvreur, le pourcentage des formes sévères est de 41 %, 8 % et 0 % pour les infections maternelles du premier, second et troisième trimestre. Il est admis que la placentopathie précède la fœtopathie et que la période la plus dangereuse se situe entre la dixième et la vingt-quatrième semaine où fréquence et gravité se conjuguent (51, 59).

Les lésions oculaires ont une existence parfois d'emblée évidente : microphtalmie, unie ou bilatérale, strabisme, le plus souvent convergent, secousses nystagmiformes. Les signes principaux sont en fait retrouvés à l'examen du fond d'œil. Ils sont représentés par la choriorétinite. Très fréquente, unie ou bilatérale, elle siège au niveau de la macula ou à la périphérie rétinienne. Il existe souvent quelques foyers disséminés. La lésion récente est faite d'une zone d'œdème choriorétinien ; la lésion ancienne est en fait beaucoup plus caractéristique. Celle-ci est représentée par un placard blanchâtre centré par une zone grise surélevée qui est limitée par des bords festonnés mais taillés à l'emporte-pièce. À leur niveau, il existe une accumulation pigmentaire. Cet aspect de la choriorétinite pigmentaire est extrêmement évocateur de la toxoplasmose congénitale. La choriorétinite est susceptible d'évolution tardive plusieurs années après la naissance.

b) Formes inapparentes de la toxoplasmose congénitale

Elles sont les plus fréquentes comme l'ont démontré plusieurs études Dans une étude prospective portant sur 210 cas de toxoplasmose congénitale (8, 65, 107, 127), Couvreur et al. ont rapporté les signes cliniques observés (31). Ils ont classé les patients en 4 catégories : des formes latentes (116 cas : 55 %), des formes bénignes se traduisant soit par une choriorétinite périphérique, soit par des calcifications cérébrales isolées sans signe clinique d'atteinte nerveuse (71 cas : 34 %), des formes graves (21 cas : 10 %) et des formes mortelles (2 cas : 0,9 %). L'étude clinique a révélé une hydrocéphalie ou une microcéphalie dans 9 % des cas, des calcifications intracrâniennes dans 11,4 % et une choriorétinite dans 22 % des cas. Cette étude, bien que datant de plus de 20 ans, reste une référence. Les travaux toulousains sur la toxoplasmose congénitale montrent que chez 30 fœtus infectés, 3 sont morts in utero et 27 étaient vivants. Dix ont des signes cliniques à la naissance (33 %) dont une choriorétinite dans 6 cas (20 %) associée dans 2 cas à des calcifications intracrâniennes. Pour tous ces enfants, le développement neurologique est normal à l'âge de 1 an (8). L'équipe montpelliéraine rapporte 12 cas de toxoplasmose congénitale s'accompagnant de signes cliniques pour 52 enfants infectés (23 %) (107). Dans une étude multicentrique récente portant sur 64 cas de toxoplasmose congénitale, 19 enfants (13 %) ont des manifestations cliniques dont 9 avec des formes sévères (6 %). D'après les auteurs, le traitement prénatal a réduit le nombre de formes sévères (65).

Ainsi, la toxoplasmose congénitale est une maladie d'un très grand polymorphisme clinique et d'une gravité extrêmement variable. L'enfant peut mourir à la naissance. Il peut au contraire tolérer son infection d'une façon apparemment parfaite. Les formes monosymptomatiques et inapparentes sont les plus fréquentes mais sont susceptibles d'évoluer secondairement, des mois ou des années après la naissance avec des manifestations oculaires du type choriorétinite. En fait, les formes sévères sont de plus en plus rares car elles sont dépistées par les échographies. Le traitement prénatal et postnatal diminue le nombre d'infection avec signes cliniques. Le problème principal reste de prévenir les choriorétinites survenant au cours des formes inapparentes après des mois ou des années.

Une étude récente lyonnaise, portant sur 358 dossiers de toxoplasmose congénitale suivis de 1988 à 2001, a prouvé que 42 % des choriorétinites ont été diagnostiquées après l'âge de 2 ans, confirmant l'importance d'un suivi ophtalmologique de ces enfants (130).

IV. Traitement

Les toxoplasmoses s'accompagnant de signes cliniques doivent être traitées (14, 28, 30, 31, 32, 41, 74, 75, 89). Les médicaments utilisés doivent toujours être prescrits sous contrôle médical.
La spiramycine (Rovamycine®) qui est un macrolide, utilisée depuis plus de 30 ans, agirait sur les ribosomes et aurait une action inhibitrice mais non lytique. Les sulfamides antifoliques agissent en inhibant la synthèse d'acide folique par compétition de la déhydroptéroate synthétase. Les sulfamides d'action rapide (sulfadiazine ou Adiazine®) sont les plus actifs et les plus utilisés. Les antifoliniques, pyriméthamine (Malocide®), sont des anti-métabolites qui inhibent la transformation de l'acide folique en acide folinique par inhibition de la dihydrofolate réductase. Cette inhibition enzymatique diminue la prolifération *in vitro* du parasite. Cette action antifolique se répercute sur les lignées cellulaires sanguines et nécessite l'adjonction d'un traitement par l'acide folinique. La pyriméthamine a une bonne diffusion tissulaire, placentaire et méningée, une concentration cellulaire et une synergie d'action avec les sulfamides et certains macrolides. Sa demi-vie longue permet son association aux sulfamides retard. L'association pyriméthamine (Malocide®) à la dose de 1 à 2 mg/kg/jour et de sulfadiazine (Adiazine®) à la dose de 0,05 à 0,10 g/kg/jour est la thérapeutique la plus active contre le toxoplasme. Elle augmente de 6 fois l'efficacité de la pyriméthamine sur le toxoplasme. Elle nécessite une surveillance hématologique hebdomadaire du fait de la toxicité sur les cellules hématopoïétiques. Le traitement doit être interrompu si le nombre de polynucléaires est inférieur à 1 000 et le nombre de plaquettes à 90 000/mm^3. Ce phénomène est réversible. L'association de la pyriméthamine et de sulfadoxine (Fansidar®), en comprimés comportant de la pyriméthamine 25 mg et sulfadoxine 500 mg est administré à la dose d'un demi-comprimé pour 10 kg de poids tous les 10 jours. Ces substances ont la même toxicité que les précédentes. La survenue de troubles cutanés doit faire interrompre le traitement (risque de syndrome de Lyell). L'acide folinique (Lederfoline® ou Elvorine®) à la dose de 5 mg tous les 3 jours ou 50 mg chez le grand enfant ou l'adulte tous les 10 jours, est donné *per os* et exerce une action préventive sur les effets secondaires hématologiques. Les sulfamides sont contre-indiqués s'il existe une allergie, une leucopénie ou un déficit en glucose 6 phosphodeshydrogénase.

A. Toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent

Les formes asymptomatiques ne sont pas traitées. Pour les formes symptomatiques, classiquement, la Rovamycine® est prescrite (9 millions d'unités/jour en 3 prises, et chez l'enfant 150 000 unités/kg/jour), pendant 3 semaines. En cas de forme clinique sévère, le protocole thérapeutique est identique à celui pratiqué chez l'immunodéprimé (4).

B. Toxoplasmose acquise de la femme enceinte

Le traitement est entrepris chez toute femme suspecte de toxoplasmose évolutive durant la grossesse pour prévenir une contamination du fœtus. Il comporte l'administration de spiramycine à la dose de 9 millions d'unités/jour en 3 prises, sans interruption jusqu'à la fin de la grossesse (74, 75). Le traitement par la spiramycine diminue les contaminations fœtales en se concentrant dans le placenta. Il limite le passage transplacentaire du parasite. L'administration de pyriméthamine et de sulfamide n'est indiquée qu'en cas de contamination fœtale prouvée par le diagnostic prénatal. Un des protocoles thérapeutiques consiste en une cure de 4 semaines de Malocide® (50 mg/jour) et Adiazine® (3 g/jour) en 2 ou 3 prises quotidiennes associées à de l'acide folinique *per os* en alternance avec la Rovamycine®. Si cela est possible une deuxième cure est réalisée. Un traitement par le Fansidar® (2 comprimés/semaine pendant 4 semaines) avec addition d'acide folinique est également possible en relais de la spiramycine. Il doit être associé à la prise d'acide folinique. Plusieurs cures sont envisageables. Les concentrations sériques de ces substances varient chez le nouveau-né et la mère (55).

Dans le cas de toxoplasmose survenant chez une femme enceinte immunodéprimée (immunodépression acquise ou thérapeutique), le traitement de référence est l'association de pyriméthamine et sulfadiazine par voie orale avec l'adjonction d'acide folinique. Le traitement d'attaque doit être poursuivi au moins 3 semaines. Il doit être relayé par un traitement d'entretien maintenu à vie pour éviter les rechutes avec les mêmes produits à des doses réduites.

C. Toxoplasmose congénitale

Quel que soit l'aspect de la maladie, la toxoplasmose congénitale objectivée par le diagnostic prénatal et néonatal impose un traitement systématique d'au minimum un an, même si l'infection est infraclinique.

Vu les résultats insuffisants obtenus avec la spiramycine, une thérapeutique postnatale a été recherchée. Le protocole de traitement préconisé dans la toxoplasmose congénitale par J. Couvreur (30) consiste à associer pyriméthamine (0,5 à 1 mg/kg/jour, *per os* tous les 2 ou 3 jours) à la sulfadiazine (50 à 80 mg/kg/jour, *per os* tous les jours en 2 prises, matin et soir) et à l'acide folinique : 5 mg par voie orale ou intramusculaire tous les 3 jours, 50 mg chez le grand enfant et l'adulte. Ces trois médicaments sont prescrits en continu dans les formes patentes durant la première année de vie. Des corticoïdes sont prescrits s'il existe des signes inflammatoires.

D'autres protocoles thérapeutiques associant pyriméthamine-sulfadoxine (Fansidar®) sont proposés et adoptés par plusieurs équipes (65, 127). L'équipe lyonnaise en a été l'initiatrice (75, 90). Le schéma thérapeutique associe, tous les 10 jours, pyriméthamine-sulfadoxine (Fansidar®) à la dose d'un demi-comprimé pour 10 kg de poids et 50 mg d'acide folinique. Le traitement est au minimum d'un an. Le traitement est institué ou poursuivi dès la naissance si la toxoplasmose congénitale a été diagnostiquée par le bilan prénatal ou néonatal.

Plusieurs études cliniques ont démontré l'efficacité de la thérapeutique par pyriméthamine et sulfamide sur l'apparition des lésions oculaires et l'évolution des

symptômes cliniques (29, 65, 79, 81, 93, 94, 101, 102). Toutefois, malgré un traitement précoce *in utero* ou dès la naissance des fœtus infectés, des choriorétinites sont encore observés mais avec une fréquence moindre (8, 33, 65, 127). Cela s'explique par le délai relativement long qui s'écoule entre la séroconversion et les résultats du diagnostic anténatal expliquant un traitement parfois tardif ou retardé.

D. Toxoplasmose de l'immunodéprimé

Le traitement de la toxoplasmose cérébrale repose sur l'association de pyriméthamine (Malocide® : 50 mg/j) et de sulfadiazine (Adiazine® : 4 à 6 g/j), administrée pendant 6 semaines, associée à de l'acide folinique (25 mg/j) pour pallier les effets antifoliques de ces deux thérapeutiques (4).
En cas d'intolérance (rash, fièvre, hématotoxicité), observée dans 50 % des cas environ mais ne nécessitant l'arrêt du traitement que dans la moitié des cas, on peut proposer, en deuxième intention, l'association pyriméthamine (50 mg/j) et clindamycine (2,4 g/j).
Le traitement d'entretien, indispensable pour prévenir les rechutes, fait appel aux mêmes molécules à dose réduite de moitié : pyriméthamine (25 mg/j) associée à la sulfadiazine (2 g/j) ; celle-ci est la plus efficace sur le toxoplasme et est également efficace en prévention de la pneumocystose ; en cas d'intolérance, on peut recourir à l'association pyriméthamine (25 mg/j) et clindamycine (1,2 g/j). Dans tous les cas, on associera l'acide folinique à raison de 25 mg 2 à 3 fois par semaine.

V. Prévention et prophylaxie

A. Prévention primaire

La première étape dans la prévention concerne les femmes enceintes et les sujets immunodéprimés non immunisés. Il faut éviter une primo-infection toxoplasmique de ces sujets. Bien qu'un vaccin vivant à usage vétérinaire existe qu'il n'est pas possible d'utiliser chez l'homme (20), la prévention repose uniquement sur des règles prophylactiques hygiéno-diététiques et sur une surveillance sérologique régulière qui est mensuelle, chez les femmes enceintes jusqu'à l'accouchement. Une lettre de recommandation doit être distribuée pour informer les femmes enceintes non immunes sur les moyens de prévention (circulaire du 27 septembre 1983). Les femmes enceintes ne connaissent pas toujours les modes de contamination dans la toxoplasmose (6). Cette étude prouve qu'il est nécessaire de renforcer, en France, le programme de prévention primaire. La persistance de la transmission du parasite chez les femmes enceintes non immunisées par consommation de viande cru, peu cuite ou salée et de crudités mal lavées, mais également par l'intermédiaire des mains ou des ustensiles de cuisine, est confirmée. Le contact avec les chats ne constitue pas un risque majeur (6-26).

Les recommandations à diffuser pour éviter une contamination sont les suivantes (6) :

- bien cuire la viande (bœuf, mouton, porc, cheval) c'est-à-dire une cuisson d'au moins 65 °C dans toute l'épaisseur de la viande. Éviter la consommation de viande marinée, fumée ou grillée (comme cela peut être le cas pour le gibier) ;
- lors de la préparation des repas : laver soigneusement les légumes et les plantes aromatiques surtout s'ils sont terreux et consommés crus. Laver soigneusement les ustensiles de cuisine, ainsi que le plan de travail. Se laver les mains après contact avec des légumes, des fruits ou de la viande crue avant de passer à table. Une bonne hygiène des mains et des ustensiles de cuisine est importante pour éviter la transmission de la toxoplasmose pendant la grossesse ;
- lors des repas pris en dehors du domicile : éviter la consommation de crudités et préférer les légumes cuits. La viande doit être consommée bien cuite ou bien privilégier la consommation de volaille ou de poisson ;
- éviter les contacts directs avec les objets qui pourraient être contaminés par les excréments de chats (comme les bacs des litières, la terre) et porter chaque fois des gants en cas de manipulation de ces objets. Désinfecter les bacs des litières de chat avec de l'eau de javel ;
- éviter le contact direct avec la terre et porter des gants pour jardiner. Se laver les mains après des activités de jardinage même si elles sont protégées par des gants.

B. Prévention secondaire

La deuxième étape dans la prévention chez la femme enceinte concerne le dépistage des toxoplasmoses acquises en cours de grossesse. La surveillance sérologique mensuelle des femmes enceintes non immunisées permet de diagnostiquer une primo-infection toxoplasmique. Il faut affirmer que la toxoplasmose est bien survenue au cours de la grossesse et préciser du mieux possible le moment de l'infestation maternelle. Cela est facile quand on observe une séroconversion au cours de la surveillance sérologique. Le diagnostic est moins évident quand la première sérologie détecte des IgG spécifiques associées à des anticorps IgM. Préciser le moment de la séroconversion est important car la fréquence et la gravité de l'atteinte fœtale dépendent du moment où l'infection est survenue en cours de grossesse. Un traitement immédiat par la spiramycine (Rovamycine®) est mis en route dès qu'une infection de la mère est suspectée, (9 MU/jour).
Chez les patients immunodéprimés, cette prévention consiste en une surveillance clinique et biologique régulière de ces sujets de manière à dépister une primo-infection ou une réactivation parasitaire et instituer une chimioprophylaxie.

C. Prévention tertiaire

La troisième étape dans la prévention de la toxoplasmose congénitale comporte le dépistage des toxoplasmoses congénitales grâce au diagnostic prénatal, néonatal et postnatal. Nous décrivons la conduite à tenir préconisée par les gynécologues-obstétriciens et pédiatres du CHU de Toulouse (7, 8, 14).

Un diagnostic anténatal est proposé aux femmes enceintes, dont l'infection est survenue en cours de grossesse, pour dépister les fœtus infectés. Il est basé sur deux types d'investigations :

• l'échographie est un des moyens de surveillance : des échographies détaillées sont pratiquées mensuellement pour mettre en évidence des signes évocateurs de toxoplasmose congénitale (dilatation des ventricules cérébraux, hépatomégalie fœtale, ascite fœtale, calcifications intracrâniennes) ;
• un prélèvement de liquide amniotique est pratiqué à partir de la vingtième semaine de grossesse et associé à l'échographie.

Les indications du diagnostic anténatal sont les suivantes :

• pour les infections maternelles survenant entre la conception et la huitième semaine d'aménorrhée (SA), les atteintes fœtales sont très rares, mais les lésions souvent graves. La surveillance clinique et échographique de la grossesse permet de déceler une atteinte fœtale sévère. Le diagnostic anténatal par prélèvement de liquide amniotique permet le dépistage de quelques cas très rares de toxoplasmose sans traduction échographique, mais n'est pas indispensable ;
• pour les infections maternelles survenant entre la neuvième et la vingt-quatrième SA, il s'agit de la période la plus dangereuse puisque fréquence et gravité se conjuguent. Le diagnostic anténatal s'impose dans tous les cas. S'il s'avère positif, il permet une prise en charge immédiate de l'enfant avec prescription d'un traitement anténatal et néonatal par l'association de pyriméthamine et sulfamide. L'interruption médicale de la grossesse doit être réservée aux patientes dont le fœtus présente des signes échographiques d'atteinte fœtale ;
• pour les infections maternelles survenant de la vingt-cinquième à la trente-deuxième SA, une séroconversion à ce stade n'expose plus à des atteintes très graves, si ce n'est la survenue d'une choriorétinite. Le diagnostic anténatal n'est pas pratiqué pour indiquer une interruption médicale de grossesse mais pour permettre un diagnostic plus précoce et un traitement anténatal puis néonatal.

Un diagnostic anténatal négatif n'exclut pas une infection du fœtus. De faux négatifs sont observés. Dans ce cas, le traitement par la spiramycine (Rovamycine®) est poursuivi sans interruption jusqu'à la fin de la grossesse.

En revanche, lorsque le diagnostic anténatal parasitologique est positif et la surveillance échographique normale, le traitement maternel est modifié. Il est remplacé par l'association pyriméthamine (Malocide®) 50 mg/jour et sulfadiazine (Adiazine®) 3 grammes/jour en 3 prises ou pyriméthamine et sulfadoxine (Fansidar®) 2 comprimés par semaine. Si le traitement est bien toléré, il est prescrit jusqu'à la 36e ou 37e SA puis la spiramycine (Rovamycine®) jusqu'à l'accouchement. L'acide folinique (Elvorine®) est associé par voie orale à la dose de 25 mg, 1 fois par semaine. Une surveillance clinique et hématologique hebdomadaire est nécessaire.

Le *dépistage néonatal et postnatal* de la toxoplasmose congénitale est effectué chez tous les enfants ayant bénéficié ou non d'un diagnostic anténatal. Le dépistage néonatal comporte un bilan clinique et paraclinique ainsi qu'un bilan biologique décrit dans un chapitre ultérieur. L'examen clinique recherche des signes d'infection fœtale. Le bilan paraclinique comporte systématiquement une échographie transfontanellaire et un fond d'œil. Le bilan biologique et clinique doit obligatoirement être effectué quand le diagnostic anténatal est négatif ou n'a pas été effectué. Le dépistage postnatal comporte des examens sérologiques, répétés régulière-

ment durant la première année. La persistance des anticorps IgG au-delà de la première année confirme une toxoplasmose congénitale. En l'absence de traitement, la négativation des IgG spécifiques l'exclut.
Dans la pratique, le traitement des enfants infectés est le suivant :

- en présence d'une forme patente avec des lésions de choriorétinite dépistée dès la naissance, le traitement est immédiatement débuté à la naissance et poursuivi jusqu'à 18 mois. Un traitement par Malocide® et Adiazine® est prescrit. Une ampoule d'acide folinique Elvorine® est donnée *per os* toutes les semaines jusqu'à la fin du traitement. La surveillance hématologique comporte une formule numération tous les 8 jours pendant les 4 premiers mois et tous les mois par la suite ;
- en l'absence de signes cliniques manifestes, un traitement discontinu de 4 ou 5 cures de 6 semaines de l'association Adiazine®-Malocide® ou de Fansidar® si le poids est supérieur à 5 kg est institué en alternance avec des cures de 6 semaines de Rovamycine® durant la première année de vie. La surveillance hématologique est identique. La surveillance clinique de ces enfants comporte un examen de fond d'œil tous les 2 à 3 mois pendant la première année de vie, tous les 3 mois jusqu'à 2 ans, tous les 6 mois jusqu'à 5 ans et tous les ans jusqu'à la fin de l'adolescence. La surveillance sérologique qui y est associée est régulière durant la première année. Le traitement institué précocement durant la grossesse chez l'enfant diminue significativement le nombre de rebonds sérologiques observés durant la première année de vie. Lorsqu'ils sont observés durant la deuxième année, une surveillance ophtalmologique rapprochée semble nécessaire. L'abstention thérapeutique est à discuter.

Chez l'immunodéprimé, devant des formes cliniques évoquant une infection toxoplasmique, un traitement doit être institué rapidement car il existe un pronostic vital.

VI. Diagnostic de l'infection toxoplasmique

Ce diagnostic est réalisé chez les femmes dont on veut connaître l'état de l'immunité au cours d'une grossesse ou antérieurement à celle-ci et chez les nouveau-nés suspects de toxoplasmose congénitale. Il est aussi pratiqué dans d'autres circonstances que la grossesse chez des sujets présentant des signes cliniques évocateurs de la maladie pour la différencier d'autres affections (maladie de Hodgkin, mononucléose infectieuse…). Il se pose également chez des sujets immunodéprimés notamment atteints de SIDA et transplantés.

A. Méthodes de diagnostic dans la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent et immunodéprimé

1. Diagnostic parasitologique

Chez les patients immunodéprimés ou en cas de toxoplasmose congénitale, la mise en évidence du toxoplasme ou d'ADN parasitaire est souvent nécessaire pour por-

line, calmoduline...). Leur présence peut expliquer certaines réactions sérologiques positives, non spécifiques de *T. gondii*. Il en est de même pour des protéines de stress (*heat-shock protein* de 70 kDa) (63).

a) Techniques sérologiques

■ *Techniques mettant en œuvre des antigènes membranaires*

Test de lyse des toxoplasmes ou « dye-test »

Ce fut la première technique à être utilisée dans le sérodiagnostic de la toxoplasmose. Mise au point par Sabin et Feldman en 1948 (117), elle fut diffusée en France par Desmonts dès 1955 (44). Son principe est basé sur l'observation microscopique de la lyse des toxoplasmes vivants sensibilisés par la présence d'anticorps spécifiques. Son avantage majeur est sa spécificité. Elle est encore une technique de référence. Elle détecte les anticorps rapidement en début d'infection. Mais la complexité de sa réalisation la réserve à quelques laboratoires spécialisés. En effet, elle nécessite des toxoplasmes vivants ce qui implique l'entretien de la souche au laboratoire. Les anticorps détectés sont en majorité des immunoglobulines G dirigés contre des structures membranaires. Les résultats sont exprimés en UI/mL par rapport à un sérum étalon de référence de l'OMS, ce qui a permis de standardiser cette technique. Le seuil de spécificité admis est de 4 unités internationales/mL (UI/mL). Des titres compris entre 4 et 300 UI/mL sont faiblement à moyennement positifs et supérieurs à 300 UI/mL fortement positifs.

Immunofluorescence indirecte

Elle utilise des toxoplasmes inactivés, déposés sur des lames de verre (2, 78). Les anticorps dirigés contre des sites antigéniques membranaires sont révélés par addition d'antiglobulines humaines marquées par un composé fluorescent, l'isothiocyanate de fluorescéine. La lecture est faite à l'aide d'un microscope à fluorescence. Cette technique détecte les IgG et les IgM selon la nature de l'antiglobuline utilisée. Elle est d'excellente valeur pour la détection des anticorps IgG. La courbe d'évolution des anticorps détectés est superposable à celle du test de lyse. Les résultats sont exprimés en UI/mL. Le seuil de spécificité se situe à 8 UI/mL (46).
En utilisant une antiglobuline anti-chaîne μ, il est possible de détecter les anticorps IgM (109). La lecture est délicate car il faut savoir différencier une fluorescence polaire limitée à l'extrémité antérieure du tachyzoïte, due à des IgM non spécifiques, d'une fluorescence du parasite entier considérée comme positive. De plus, la détection des IgM spécifiques par cette méthode manque de sensibilité.

Réaction d'agglutination directe

Simple de réalisation, elle met en présence une suspension de toxoplasmes formolés et le sérum du patient (34, 72). La présence des anticorps entraîne la formation d'un voile d'agglutination des toxoplasmes. L'emploi du 2- mercaptoéthanol rend la réaction spécifique pour la détection des anticorps IgG en éliminant les immunoglobulines M. Cette réaction ne doit pas être utilisée pour révéler les anticorps IgM car elle manque de sensibilité et de spécificité. Une variante de ce test est actuellement plus utilisée. Une suspension de toxoplasmes préalablement soumis à un traitement enzymatique par la trypsine, ce qui révèle un plus grand nombre d'antigènes, est employée dans ce test (49). Il a, de ce fait, une meilleure sensibi-

lité. L'expression des résultats se fait en UI/mL et le seuil de spécificité est fixé à 4 UI/mL. La réaction est effectuée en présence de 2 mercapto-éthanol ce qui la rend spécifique. Seules les IgG sont détectées. Pour les sérums positifs, il est possible d'effectuer un titrage mais il nous paraît préférable de la coupler à une autre technique de dosage quantitatif des IgG spécifiques car l'évolution des anticorps révélés grâce à cette technique est très différente des précédentes.
Une deuxième variante concerne un test d'agglutination pratiqué avec un antigène traité à l'acétone. Les sérums de sujets atteints de toxoplasmose à la phase aiguë agglutinent les suspensions fixées au formol et celles traitées à l'acétone. En revanche, les sérums de sujets atteints d'une infection ancienne, qui agglutinent parfois très fortement l'antigène formolé, n'agglutinent que peu ou pas l'antigène traité à l'acétone. Il est ainsi possible d'apprécier le stade de l'infection (37, 123).

■ *Techniques mettant en œuvre des extraits antigéniques solubles*

Différentes techniques d'extraction des antigènes sont possibles : broyage des toxoplasmes, congélation et décongélation, ultrasonat, lyse osmotique. Les antigènes solubles peuvent être enrichis en protéines de membrane, en particulier la protéine P30, grâce à l'utilisation d'agents de solubilisation des composants membranaires. Les protéines recombinantes sont encore peu utilisées dans ce diagnostic.

Réaction de fixation du complément

Méthode ancienne, n'est plus pratiquée.

Hémagglutination indirecte

Elle est réalisée à partir de la fixation d'un antigène soluble sur des hématies (118, 120). L'emploi du 2 mercapto-éthanol permet de rendre spécifique la réaction pour la détection des IgG. Elle ne doit pas être utilisée pour la détection des IgM. Les anticorps IgG sont détectés avec retard en début d'infection. Cette détection est d'autant plus tardive que l'antigène est à composant majeur cytoplasmique.

Réaction d'agglutination de particules de latex sensibilisées

Elle est basée sur un principe comparable à celui de la réaction d'hémagglutination. Des particules de latex sont revêtues d'antigènes toxoplasmiques solubles (113). De réalisation très simple et rapide à exécuter, la réaction s'effectue habituellement sur lame sans diluer le sérum. Un phénomène de zone est observé lorsque les titres en anticorps sont très élevés, conduisant à de faux négatifs. Méthode qualitative, ce dépistage doit être couplé à une méthode de titrage quantitatif pour les IgG. De faux positifs peuvent être observés, liés à des IgM non spécifiques car cette méthode détecte l'ensemble des immunoglobulines sériques.

Réactions immuno-enzymatiques

Ces techniques ont été appliquées initialement au sérodiagnostic de la toxoplasmose il y a une vingtaine d'années (109, 119, 128). Des antigènes solubles, enrichis en composants membranaires, en particulier en protéine P30, sont fréquemment utilisés. Les antigènes fixés sur un support solide sont incubés avec une dilution de l'échantillon sérique. Les anticorps spécifiques se fixent, puis sont mis en évidence par une antiglobuline anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgM humaine marquée par une enzyme. L'hydrolyse d'un substrat spécifique aboutit à la formation d'un composé coloré ou fluorescent quantifiable grâce à un spectrophotomètre ou

un fluorimètre. Ces méthodes sont actuellement utilisées par la majorité des biologistes. Elles ont l'avantage d'être automatisables et reproductibles. La sensibilité et la spécificité dépendent du réactif. Elles demandent encore une standardisation au niveau de la caractérisation des antigènes et au niveau de l'expression des résultats en unités internationales. Les résultats ne sont pas superposables ni d'un réactif à un autre, ni avec les autres techniques (42). La nature du support des antigènes, le mode de révélation, l'étalonnage, expliquent ces différences.

Les réactions sérologiques où les antigènes sont des extraits parasitaires solubles détectent généralement les anticorps IgG moins rapidement après la séroconversion (108). Si les anticorps IgG sont spécifiques et faciles à mettre en évidence, excepté pour les titres limites se situant autour du seuil de spécificité des méthodes, il est plus difficile de détecter les IgM spécifiques. Pour ces dernières, des résultats faussement négatifs ou faussement positifs sont observés. Les faux négatifs résultent d'un phénomène de compétition entre IgG et IgM spécifiques. Les anticorps IgG peuvent saturer les sites antigéniques et empêcher la fixation des anticorps IgM quand ils sont en quantité importante dans le sérum. Les faux positifs peuvent être dus à la présence sérique d'un facteur rhumatoïde de nature IgM anti-IgG. Ils sont observés si un sérum contient à la fois des IgG antitoxoplasmiques et un facteur rhumatoïde. La présence d'IgM naturelles est une autre cause de faux positifs (47, 106). Ces anticorps IgM sont indépendants d'une infection toxoplasmique. Ils reconnaissent des structures antigéniques du toxoplasme. Ils sont absorbés par les suspensions du parasite. Ils sont absents du sang du cordon ou du nourrisson tant que les IgG maternelles antitoxoplasmiques sont présentes (47).

En prétraitant les sérums avec un réactif qui élimine les IgG par absorption à l'aide d'une antiglobuline anti-IgG humaine, les interférences dues au facteur rhumatoïde et le phénomène de compétition observé pour les titres élevés en IgG sont évités. En revanche, les IgM naturelles ne peuvent pas être différenciées des IgM spécifiques et éliminées.

■ *D'autres méthodes basées sur un principe différent ont été proposées*

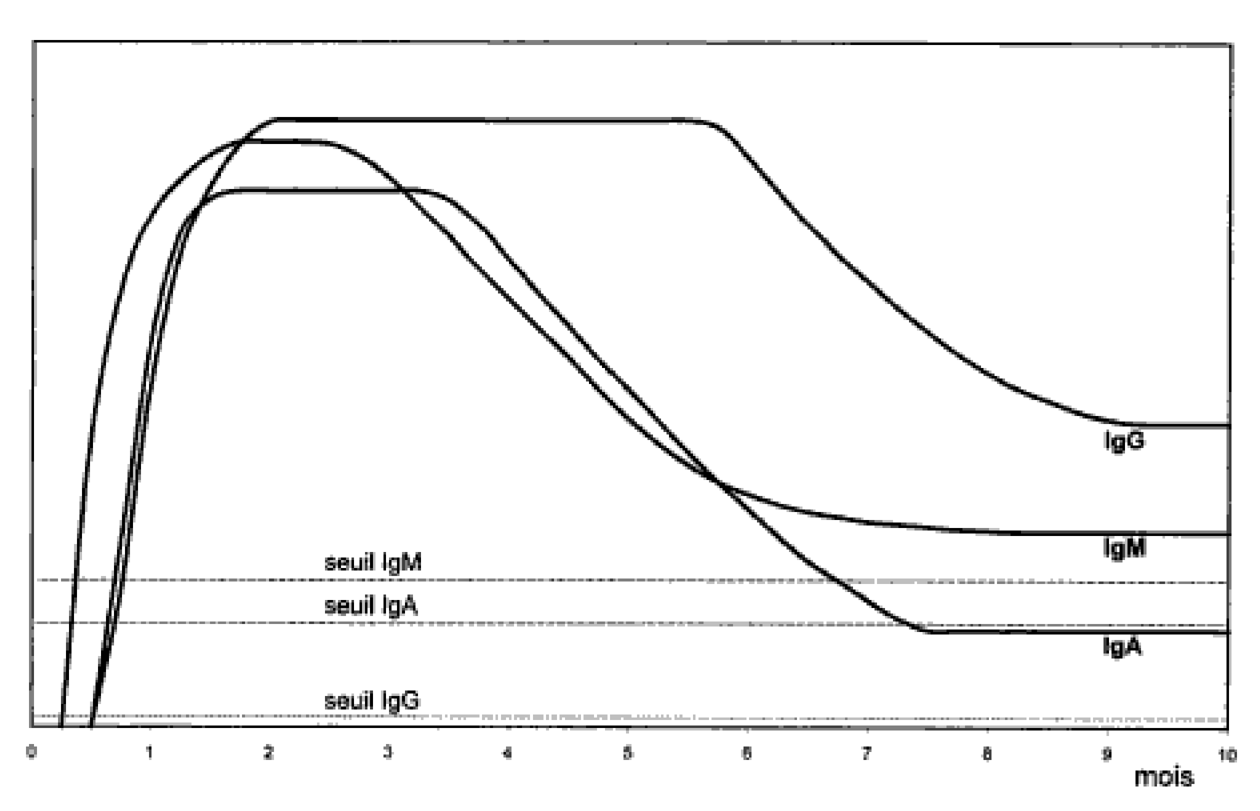
Méthodes par immunocapture

Simples à exécuter, les tests par immunocapture des IgM sériques ont été les premiers mis en œuvre, évitant les phénomènes de compétition entre les IgG et les IgM spécifiques ainsi que les interférences dues au facteur rhumatoïde. La recherche des IgM spécifiques comporte deux étapes. La première, commune à toutes les techniques, correspond à l'immunocapture des IgM du sérum par une antiglobuline antichaîne μ humaine fixée sur un support. Les IgM capturées sont ainsi séparées des autres composants du sérum, donc des IgG. Dans la deuxième étape, l'antigène toxoplasmique est rajouté. Une réaction antigène anticorps se produit qui peut être quantifiée de différentes manières. Dans l'ISAGA (IgM Immunosorbent Agglutination Assay), les IgM antitoxoplasmiques sont révélées par l'addition de suspensions de toxoplasmes à différentes concentrations (50). Une réaction positive se traduit par une agglutination des toxoplasmes. De réalisation simple, elle nécessite des suspensions d'antigènes très standardisées. L'ISAGA est actuellement la méthode la plus sensible pour détecter les anticorps IgM. Dans les techniques immuno-enzymatiques, la révélation se fait habituellement par addition d'antigènes solubles puis révélation par des anticorps antitoxoplasmiques marqués par une enzyme et hydro-

élevés persistent pendant plusieurs mois, minimum 6 à 8 mois puis diminuent lentement. Lorsqu'on met en œuvre des extraits antigéniques solubles, les anticorps IgG sont détectés plus ou moins précocement suivant la nature de l'antigène, extrait soluble cytoplasmique pur ou mixte enrichi en antigènes membranaires. Le décalage est de quelques jours à 1 mois par rapport aux anticorps de spécificité antimembranaire ; les IgG augmentent puis atteignent un maximum 3 à 6 mois plus tard. Quelle que soit la technique, les titres ensuite décroissent. Des taux résiduels sont le témoin d'une immunité ancienne.

■ *Anticorps IgA*

La sécrétion des anticorps IgA survient dans le premier mois de l'infection. À cette période, leur cinétique est comparable à celle des IgG. La production est maximale 2 à 3 mois après la contamination. Elle se négative, dans la majorité des cas, dans un délai de 1 an. Toutefois, l'absence de production d'anticorps IgA a pu être observée lors de séroconversions (environ 5 % des cas). Au cours des réactivations toxoplasmiques, elles peuvent être détectées.
Une courbe théorique d'évolution des anticorps IgA, IgG et IgM au cours d'une toxoplasmose acquise est présentée dans la *figure* 2.



IgM et IgA détectées par une méthode d'immunocapture et IgG détectées par technique d'immunofluorescence

Figure 2. Cinétique d'évolution des anticorps IgG, IgM et IgA au cours d'une toxoplasmose évolutive.

Si cette évolution est celle de la majorité d'infections, d'autres types de réponses humorales peuvent être observés (53) :

- réactions majorées et prolongées avec un titre élevé d'IgG, ou bien d'IgG et d'IgM, mais persistant pendant des années. Ces formes sont souvent associées à des manifestations cliniques ;

- réactions minimes, les tests décelant les IgG passent de négatif à positif mais les anticorps IgG n'augmentent pas. Les tests révélant des IgM sont plus ou moins fortement positifs. Cette coexistence d'IgM et d'IgG à des titres faibles peut se prolonger pendant des mois, voire des années. Ce type réactionnel s'observe très souvent lorsque le traitement est intervenu précocement. Il peut parfois s'observer chez des sujets non traités, le plus souvent sans aucune manifestation clinique ;
- réactions sans détection d'anticorps IgM. Les tests décelant les IgG spécifiques passent de négatif à positif, puis à fortement positif sans que l'on mette en évidence d'IgM. Cela suggère des réinfestations. Les tests de détection des IgG manquant alors de sensibilité aux valeurs seuil.

Il faut savoir différencier un profil sérologique témoin d'une primo-infection toxoplasmique de celui d'une réactivation sérologique qui se caractérise par une augmentation du titre des anticorps IgG sans détection d'IgM associé ou non à la production d'IgA chez un sujet préalablement immunisé.

c) Guide d'interprétation de la sérologie de la toxoplasmose

Le diagnostic repose obligatoirement sur plusieurs critères (14, 16).

■ *Détection des anticorps IgG*

La technique de dosage et le titre des IgG sont à prendre en considération. La technique doit être sensible pour dépister des titres très faibles et spécifique de manière à conclure avec certitude à une immunité. En cas de valeurs limites, un deuxième test de détection des anticorps IgG doit être mis en œuvre comme le préconise la nomenclature des actes de biologie médicale. Les résultats doivent être exprimés en unités internationales par rapport à un sérum étalon de référence. Les seuils de spécificité de la technique, précisés par le fabricant, doivent être respectés car ils varient avec les réactifs. De ce fait, ils doivent figurer sur les comptes rendus d'analyse. L'augmentation, la décroissance ou la stabilité du titre des IgG spécifiques doivent être étudiées pour donner une interprétation, ce qui impose de prélever deux sérums à 3 semaines d'intervalle. Les sérums doivent alors être testés dans le même laboratoire, avec la même technique et dans la même série d'examens Pour conclure à une augmentation significative du titre des anticorps IgG, celui-ci doit être au moins multiplié par 2. Les anticorps ont une cinétique différente en fonction des antigènes contre lesquels ils sont dirigés. Les techniques utilisant des antigènes membranaires révèlent des anticorps synthétisés plus précocement que celles mettant en œuvre des antigènes solubles cytoplasmiques. Elles sont donc plus performantes pour le dépistage des séroconversions. Un traitement institué précocement peut modifier la cinétique des anticorps. La mesure de l'avidité des IgG peut contribuer à la datation de l'infection.

■ *Détection des anticorps IgM*

La mise en évidence des anticorps IgM évoque une infection récente mais n'est pas suffisante pour l'affirmer. Produits en début d'infection, dans les 10 premiers jours suivant la contamination, il est fréquent de les détecter 1 an après la contamination (dans notre expérience, cela a pu être observé 10 ans après l'infection). Des IgM non spécifiques peuvent interférer et entraîner de faux positifs dans les tests sérologiques : facteurs rhumatoïdes, IgM naturelles, IgM synthétisées contre

d'autres micro-organismes. Le test ISAGA et les techniques immuno-enzymatiques, actuellement les plus utilisés par les biologistes, sont sensibles mais manquent de spécificité. Un test négatif n'est pas en faveur d'une infection récente. En revanche, si le test est positif, il est difficile de conclure à une infection récente sur ce seul critère. D'autres tests sont nécessaires : détection des anticorps IgA ou/et mesure de l'avidité des anticorps IgG.

■ *Détection des anticorps IgA*

Elle peut contribuer à la datation de l'infection. La synthèse des IgA est moins précoce que celle des IgM. On n'observe pas d'interférence avec des IgA non spécifiques. Un schéma d'interprétation du sérodiagnostic est proposé, basé sur la cinétique des anticorps IgG et IgM (*fig. 3*). Il est particulièrement important de dater avec précision l'infection chez la femme enceinte ou chez le patient immunodéprimé pour définir la conduite à tenir ultérieure.

En règle générale, on peut conclure à une infection récente datant de moins de 2 mois si une augmentation du titre des anticorps IgG antimembranaires est observée sur 2 sérums prélevés à 3 semaines d'intervalle, associée à la présence d'IgM. L'infection peut être relativement récente, mais date d'au moins 2 mois si des IgM antimembranaires sont à des titres stables, associées à une avidité faible et à la présence d'IgM et d'IgA spécifiques. Si les IgG sont à des titres stables avec une avidité élevée et associées à la présence d'IgM, l'infection a au moins 4 à 5 mois d'évolution. En l'absence d'IgM, la présence simultanée d'IgA et d'IgG spécifiques ou l'ascension des IgG est en faveur d'une réactivation sérologique. Ces interprétations ne sont valables que pour des sujets immunocompétents, n'ayant pas reçu d'injection de gammaglobulines ou de transfusions.

Chez le sujet immunodéprimé, la réponse immunitaire humorale est altérée. Dans le cas d'une primo-infection, la synthèse d'anticorps peut être abolie ou retardée.

B. Dépistage de la toxoplasmose congénitale : diagnostic prénatal, néonatal et postnatal

Chez la femme enceinte, le dépistage d'une séroconversion toxoplasmique repose sur la sérologie. Pour les enfants dont la mère a contracté la toxoplasmose durant la grossesse se pose alors le diagnostic de l'infection fœtale. L'identification comporte un diagnostic parasitologique avec mise en évidence de *Toxoplasma gondii* et/ou un diagnostic sérologique.

1. Dépistage de l'infection *in utero* : diagnostic prénatal

Il a été introduit et développé en France par Daffos *et al.* pour porter un diagnostic d'infection fœtale et traiter *in utero* le fœtus par l'association pyriméthamine et sulfamide (36). Cette équipe a ensuite prouvé que le diagnostic parasitologique par mise en évidence de *Toxoplasma gondii* dans le liquide amniotique grâce aux techniques de biologie moléculaire était aussi performante que le diagnostic établi par les recherches parasitologiques et immunologiques sur le sang fœtal (82). De ce fait, le diagnostic anténatal est établi grâce à une amniocentèse par prélèvement de liquide amniotique.

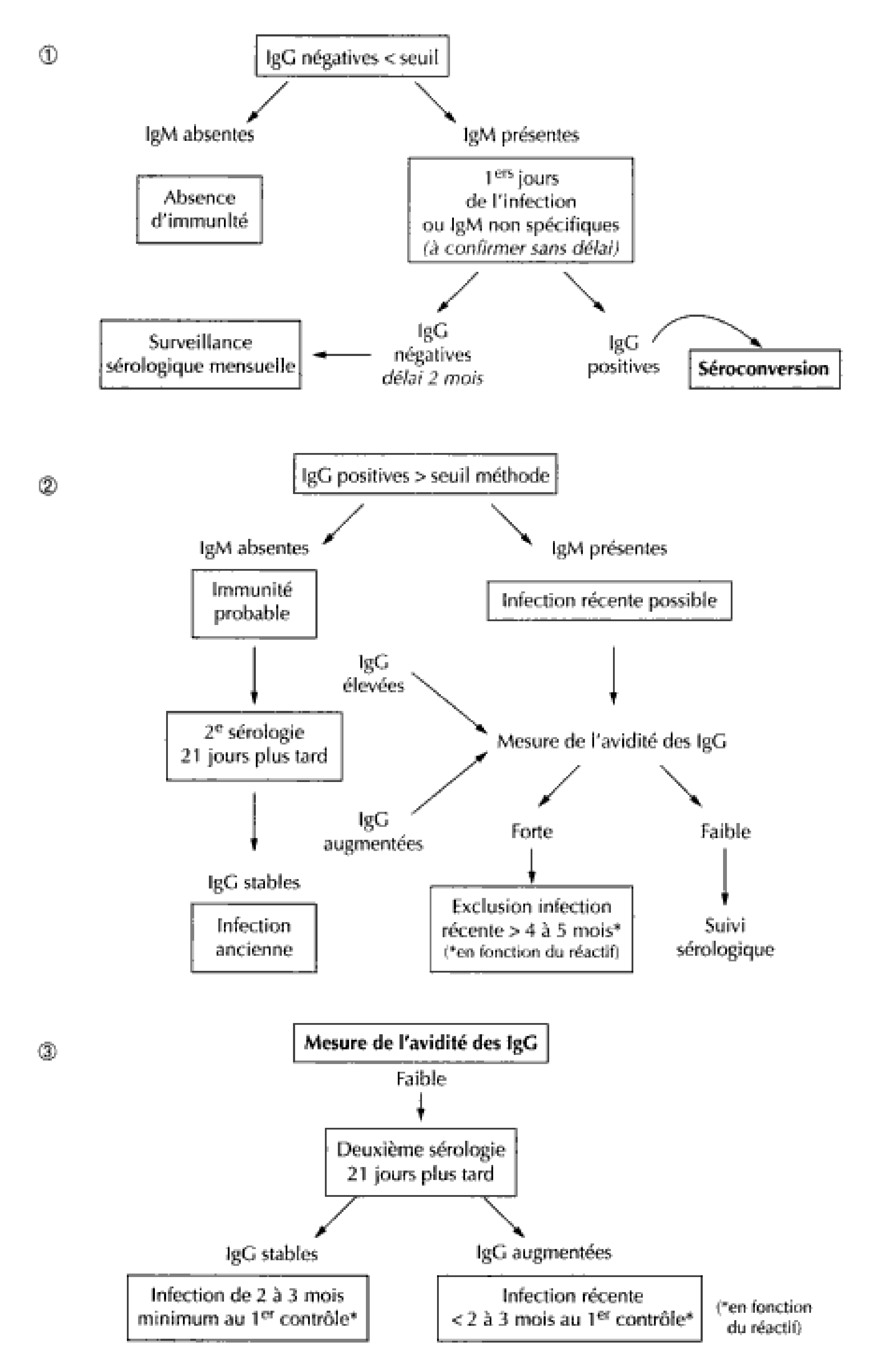


Figure 3. Dépistage sérologique chez la femme enceinte immunocompétente. Algorithme décisionnel (laboratoire de parasitologie, CHU Toulouse) REF

Ce diagnostic comporte une recherche du parasite dans le liquide amniotique par deux méthodes, inoculation à la souris et techniques de biologie moléculaire. Le liquide amniotique peut être prélevé après la vingtième semaine de grossesse en respectant un délai d'au moins 3 à 4 semaines, entre la date de la séroconversion maternelle et celle de la ponction, ce qui diminue le nombre de faux négatifs. Ce diagnostic est à présent effectué dans tous les cas de séroconversion toxoplasmique survenue au cours de la grossesse. Le liquide amniotique ne doit pas être congelé mais conservé à 4 °C. Il doit être acheminé dans les 24 heures vers un laboratoire spécialisé.

Le décret n° 95-559 du 6 mai 1995 précise les dispositions légales relatives aux analyses de biologie pratiquées en vue d'établir un diagnostic prénatal *in utero*. Une autorisation ministérielle est nécessaire pour réaliser ce diagnostic. Un consentement écrit des patientes est requis avant la mise en œuvre d'un diagnostic prénatal de la toxoplasmose. Les copies doivent être adressées au praticien réalisant les analyses et doivent être conservées avec le compte rendu (*JO*, arrêté du 12 novembre 1997).

a) Diagnostic prénatal par mise en évidence d'ADN toxoplasmique

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été appliquée au diagnostic de la toxoplasmose depuis plus de 10 ans (82). Le gène B1 a été fréquemment choisi comme cible car il est spécifique de *Toxoplasma gondii* et répété 35 fois dans le génome du parasite (19). Cazenave *et al.* ont choisi un fragment de gène d'ADN ribosomal également répété un grand nombre de fois (24). Une séquence répétée 200 à 300 fois dans le génome a été récemment décrite comme spécifique et sensible pour le diagnostic de toxoplasmose (23). La mise au point de la technique PCR doit être effectuée dans chaque laboratoire, en l'absence de kit spécialisé pour ce diagnostic. Les amorces sont choisies dans le gène-cible retenu.

La technique PCR comporte plusieurs étapes (13).

La première étape comporte l'extraction de l'ADN. Dans la deuxième étape est réalisée l'amplification sélective, ou *polymerase chain reaction* (PCR), d'un fragment du gène choisi. La PCR est basée sur la propriété fondamentale de l'enzyme ADN polymérase qui assure la réplication de l'ADN chez les organismes vivants. Cette enzyme est capable de recopier un brin d'ADN utilisé comme matrice en un brin complémentaire par élongation de l'extrémité 3'OH libre d'une amorce oligonucléotidique appariée à la matrice. Il s'agit d'un mécanisme de duplication de l'ADN *in vitro* mimant, en vitesse accélérée, la réplication de l'ADN *in vivo*. Le procédé nécessite la succession de nombreux cycles avec trois étapes, chacune se déroulant pendant un temps très court et à une température bien définie. Les trois étapes sont la dénaturation de l'ADN par la chaleur qui est rendu monobrin, puis de l'hybridation après avoir refroidi le mélange à la température d'hybridation des amorces, enfin de l'élongation à partir des amorces à la température optimale d'activité de l'enzyme ADN polymérase, enzyme stable à haute température, qui assure la réplication de l'ADN.

Ces différentes étapes réalisent un cycle qui, répété plusieurs dizaines de fois, permet d'obtenir des millions de copies d'un même fragment d'ADN. La technique PCR est rendue semi-automatisable par l'utilisation de blocs thermiques programmables.

Le problème majeur de la PCR est le risque de contamination des échantillons par les produits d'amplifications antérieures, ce qui impose une organisation adéquate

du laboratoire avec un cloisonnement des locaux en zone pré et post-PCR. Pour limiter ce risque, une enzyme (l'uracyl-N-glycosylase), capable de détruire d'éventuels amplicons contaminants tout en conservant l'ADN natif-cible, est ajoutée au niveau de la réaction d'amplification génique.
Dans une dernière étape, la spécificité des produits d'amplification est vérifiée par hybridation avec une sonde. La technique du southern-blot (transfert de l'ADN amplifié sur membrane) a été tout d'abord utilisée. Mais elle se révèle longue et de réalisation délicate. De ce fait, des tests en microplaques où l'ADN est révélé par technique immuno-enzymatique ont été proposés. D'autres systèmes de révélation peuvent être utilisés.
Une nouvelle approche, la PCR en temps réel, est de plus en plus pratiquée. C'est un processus automatisé qui repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de la PCR. L'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Cette méthode est sensible, rapide, sans manipulation post-amplification, ce qui réduit les risques de contamination post-PCR (23).

b) Isolement du toxoplasme par inoculation à la souris

Cette technique fut la première utilisée pour le diagnostic parasitologique (48). Dans notre protocole, l'inoculation à la souris est utilisée comme deuxième méthode de mise en évidence du toxoplasme dans le liquide amniotique. À partir du culot de centrifugation de liquide amniotique, l'inoculation à des souris est réalisée par injection intrapéritonéale de 1 mL du culot. Des contrôles sérologiques sont effectués chez la souris 4 et 6 semaines plus tard. En cas de positivité, les kystes seront recherchés au niveau du cerveau. Bien que le délai de réponse soit relativement long, elle est d'une meilleure sensibilité que l'inoculation sur culture cellulaire.
L'inoculation à la souris permet de confirmer les résultats obtenus par les techniques de biologie moléculaire et reste une technique de référence car elle permet d'isoler les souches et de les conserver pour des études épidémiologiques.
La technique PCR, appliquée au liquide amniotique, a une meilleure sensibilité que l'inoculation à la souris, comme l'ont prouvé plusieurs études (13, 15, 82). Une étude toulousaine a démontré une sensibilité de la PCR de 90 % et une spécificité de 100 % (16). Dans un autre travail concernant 94 examens prénataux, la sensibilité de la PCR est de 76 % et la spécificité de 100 % (111). Un diagnostic anténatal négatif n'exclut pas une infection du fœtus. Des faux négatifs sont observés par plusieurs équipes dont la nôtre (8, 36, 80, 107, 115).

2. Diagnostic néonatal

Lorsque le diagnostic prénatal est négatif ou n'a pas été effectué, un diagnostic néonatal s'impose. Outre le bilan clinique et paraclinique, dont un examen du fond d'œil et une échographie transfontanellaire, il comporte un diagnostic parasitologique et sérologique.
Le *diagnostic parasitologique* consiste à rechercher le parasite dans le placenta voire le sang de cordon. Ces prélèvements doivent parvenir aux laboratoires spécialisés qui effectuent ces recherches dans des conditions particulières : 100 à 200 g de

- 38. Darde M.-L. *Biodiversity in* Toxoplasma gondii. Toxoplasma gondii. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. U. Gross (Ed), Springer 1996 : 27-41.
- 39. Decoster A., Darcy A., Caron, Capron A. IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. *Lancet* 1988 ; 2 : 1104-6.
- 40. Decoster A., Darcy F., Caron A., Vinatier D., Houze de l'Aulnoit, Vittu G., Niel G., Heyer F., Lecolier B., Delcroix M., Monnier J.-C., Duhamel M., Capron A. Anti P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital Toxoplasma infection. *Clin Exp Immunol* 1992 ; 87 : 310-5.
- 41. Derouin F. Drug effective against *Toxoplasma gondii*. Present status and future in *Congenital toxoplasmosis*. P. Ambroise-Thomas and E. Petersen Ed ; Springer-Verlag Ed, Paris 1999 : 95-100.
- 42. Derouin F., Garin J.-Y.-F., Buffard C., Berthelot F., Petithory J.-C. Étude multicentrique de la sérologie toxoplasmique par différents réactifs ELISA commercialisés. *Bulletins OMS* 1994 ; 72 (2) : 249-56.
- 43. Derouin F., Leport C., Pueyo S., Morlat P., Letrillart B., Chene G., Ecobichon J.-L., Luft B., Aubertin J., Hafner R., Vilde J.-L. Predictive value of *Toxoplasma gondii* antibody titres on the occurrence of toxoplasmic encephalitis in HIV infection patients. *AIDS* 1996 ; 10 : 1521-27.
- 44. Desmonts G. Sur la technique de l'épreuve de lyse des toxoplasmes. *Arch. Biol Med*, 1955 ; 31 : B193-B198.
- 45. Desmonts G. Definitive serological diagnosis of ocular toxoplasmosis. *Arch. Ophthalmol* 1966 ; 76 : 839-51.
- 46. Desmonts G., Niel G., Gentilini M., Couvreur J. Standardisation du sérodiagnostic de la toxoplasmose. *La Nouv Presse Médicale* 1973 ; 2 (23) : 1601-3.
- 47. Desmonts G., Baufine-Ducrocq H., Couzineau P., Peloux Y. Anticorps toxoplasmiques naturels. *La Nouv Presse Médicale* 1974 ; 3 : 1547-9.
- 48. Desmonts G., Couvreur J. L'isolement du parasite dans la toxoplasmose congénitale : intérêt pratique et thérorique. *Arch. Fran Ped* 1974 ; 31 : 157-66.
- 49. Desmonts G., Remington J.-S. Direct agglutination test for diagnosis of Toxoplasma infection. Method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* 1980 ; 11 : 562-8.
- 50. Desmonts G., Naot Y., Remington J.-S. Immunoglobulin M immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases : diagnosis of acute Toxoplasma infections. *J Clin Microbiol* 1981 ; 14 : 486-91.
- 51. Desmonts G., Couvreur J. Toxoplasmose congénitale : étude prospective de l'issue de la grossesse chez 542 femmes atteintes de toxoplasmose acquise en cours de gestation. *Ann. Pediatr* 1984 ; 31 : 805-9.
- 52. Desmonts G., Couvreur J., Tounier G., Colin J. La production locale accrue d'immunoglobulines spécifiques G dans le liquide céphalo-rachidien au cours de la toxoplasmose congénitale. *Ann. Pediatr* 1984 ; 31 : 829-35.
- 53. Desmonts G., Couvreur J., Thulliez P., Saint-Joigny G., Colin J. Sérodiagnostic de la toxoplasmose acquise : des méthodes simples, pour des questions précises. *Concours Med* 1985 ; 107 : 227-34.
- 54. Desmonts G., Couvreur J., Thulliez P. Toxoplasmose congénitale : 5 cas de transmission à l'enfant d'une infection maternelle antérieure à la grossesse. *Presse Médicale* 1990 ; 19 (31) : 1445-9.
- 55. Dorangeon P.-H., Fay R., Marx-Chemla C., Leroux B., Harika G., Dupouy D., Quereux C., Choisy H., Pinon J.-M., Wahl P. Passage transplacentaire de l'association pyriméthamine-sulfadoxine lors du traitement anténatal de la toxoplasmose congénitale. *Presse Médicale* 1990 ; 19 (44) : 2036.
- 56. Dubey J.-P., Beattie C.-P. Toxoplasmosis of animals and man, *Ed CRC Press*, Boca Raton Florida (USA) ; 1988.
- 57. Dubey J.-P., Lindsay D.-S., Speer C.-A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. Bra dyzoites, and sporozoïtes and biology and development of tissues cysts. *Clin Micro biol Rev* 1998 ; 11 (2) : 267-99.

- 58. Dunn D., Newell M.-L., Gilbert R., Mok J., Petersen E., Peckham C. Low incidence of congenital toxoplasmosis in children born to women infected with human immuno deficiency virus. *Eur J Obst Gynecol* 1996 ; 68 : 93-6.
- 59. Dunn D., Wallon M., Peyron F., Petersen E., Peckham C., Gilbert R. Mother to child transmission of toxoplasmosis : risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 1999 ; 253 : 1829-33.
- 60. Dupouy-camet J., Lavareda de Souza S., Maslo C., Paugam A., Saimot A.-G., Benarous R., Tourte-Schaefr C., Derouin F. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993 ; 31 (7) : 1866-9.
- 61. Dupouy-Camet J., Gavinet M.-F., Paugam A., Tourte-Schaefer C. Mode de contamination, incidence et prévalence de la toxoplasmose. *Med Mal Infect* 1993 ; 23 (numéro spécial) : 139-47.
- 62. Fortier B., Pinto-Sousa M.-l., Ajana F. *Toxoplasma gondii* : 2 cas de recontamination sur terrain immun. *Presse Médicale* 1991 ; 20 (41) : 2109.
- 63. Fortier B., Ajana F. Toxoplasme et toxoplasmose. *EMC* 1993 ; 1-10.
- 64. Fortier B., Coignard-Chatain C., Dao A., Roulaud V., Valat A.-S., Vinatier D., Lebrun T. Étude des poussées cliniques évolutives et des rebonds sérologiques d'enfants atteints de toxoplasmose congénitale et suivis durant les 2 premières années de vie. *Arch. Pediatr* 1997 ; 4 : 940-6.
- 65. Foulon W., Villena I., Stray-Pedersen B., Decoster A., Lappalainen M., Pinon J.-M., Jenum P.-A., Hedman K., Naessens A. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy : a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol* 1999 ; 180 : 410-5.
- 66. Franck J., Mary E., Jarroux E., Dumon H., Quilici M. Apport du western-blot au diagnostic de la toxoplasmose congénitale. *Bull Soc Franç Parasitol* 1992 ; 10 (1) : 3-7.
- 67. Franck J., Mary E., Jarroux E., Dumon H., Quilici M. Apport de l'immunoblot au diagnostic et à la surveillance de la toxoplasmose au cours du syndrome d'immunodéficience acquise. *Pathol Biol* 1993 ; 41 (9) : 865-72.
- 68. Frenkel J.-K., Dubey J.-P., Miller N.-L. *Toxoplasma gondii* : fecal forms separated from eggs of the nematode. *Toxocara cati Science* 1969 ; 164 : 432.
- 69. Frenkel J., Taylor D.-W. Toxoplasmosis in immunoglobulin M suppressed mice. *Inf Immun* 1982 ; 38 (1) : 360-7.
- 70. Frenkel J.-K. Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol Today* 1988 ; 4 : 273-8.
- 71. Friker-Hidalgo H., Pelloux H., Racinet C., Grefenstette I., Bost-Bru C., Goullier-Fleuret A., Ambroise-Thomas P. Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placenta from infected women by polymerase chain reaction, *in vivo* and *in vitro* cultures. *Placenta* 1998 ; 19 (7) : 545-9.
- 72. Fulton J.-D., Turk J.-L. Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet* 1959 ; 11 : 1068-9.
- 73. Gallino A., Maggiorini M., Kiowski W., Martin X., Wunderli W., Schneider J., Turina M., Follath F. Toxoplasmosis in heart transplant recipients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996 ; (5) : 389-93.
- 74. Garin J.-P., Pellerat J., Maillard M., Woehrle R., Hezez G. Bases théoriques de la prévention par la spiramycine de la toxoplasmose congénitale chez la femme enceinte. *Presse Médicale* 1968 ; 76 : 2266.
- 75. Garin J.-P., Mojon M., Piens M.-A., Chevalier-Nuttall I. Surveillance et traitement de la toxoplasmose chez la femme enceinte, le fœtus et le nouveau-né. *Ped* 1989 ; 44 : 705-12.
- 76. Gavinet M.-F., Robert F., Firtion G., Delouvrier E., Hennequin C., Maurin J.-R., Tourte- Scaeffer C., Dupouy-Camet J. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *J Clin Microbiol* 1997 ; 35 (5) : 1276-7.
- 77. Gilbert R.-E., Stanford M.-R. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection ? *Br J Ophthalmol* 2000 ; 84 : 224-6.
- 78. Goldman M. Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein labelled antibody. II A new serological test for antibodies to Toxoplasma based upon inhibition of specific staining. *J Exp Med* 1957 ; 105 : 549-73.

toxoplasmosis in the neonatal period : a multicenter evaluation. *J Pediatr* 1999 ; 135 (6) : 714-9.

- 99. Naot Y., Remington J.-S. An enzyme linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* : use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis*, 1980 ; 142 (5) : 757-66.
- 100. Ongkosuwito J.-V., Bosch-Driessen E.-H., Kijlstra A., Rothova A. Serologic evaluation of patients with primary and recurrent ocular toxoplasmosis for evidence of recent infection. *Am J Ophthalmol* 1999 ; 128 : 407-12.
- 101. Patel D.-V., Holfels E.-M., Vogel N.-P., Boyer K.-M., Mets M.-B., Swisher C.-N., Roizen N.-J., Stein L.-K., Stein M.-A., Hopkins J., Withers S.-E., Mack D.-G., Luciano R.A., Meier P., Remington J.-S., Mc Leod R.-L. Resolution of intracranial calcifications in infants with treated congenital toxoplamosis. *Radiology* 1996 ; 199 (22) : 433-40.
- 102. Peyron F., Wallon M., Bernardoux C. Long term follow-up of patients with congenital ocular toxoplasmosis. *N Engl J Med* 1996 ; 334 (15) : 993-4.
- 103. Pinon J.-M., Thoannes P.-H., Pouletty J., Poirriez J., Damines P., Pelletier D. Detection of IgA specific for toxoplasmosis in serum and cerebrospinal fluid using a non-enzyma tic IgA-capture assay. *Diagn Immunol* 1986 ; 16 : 471-4.
- 104. Pinon J.-M., Chemla C., Villena I., Foudrinier F., Aubert D., Puygauthier-Toubas D., Leroux B., Dupouy D., Quereux C., Talmud M., Trenque T., Potron G., Pluot M., Remy G., Bonhomme A. Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis : value of com- parative enzyme-linked immunofiltration assay immunological profiles and anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M (IgM) or IgA immunocapture and implications for postnatal therapeutic strategies. *J Clin Microbiol* 1996 ; 34 (3) : 579-83.
- 105. Pons J.-C., Sigrand C., Grangeot-Keros L., Frydman R., Thulliez P. Congenital toxoplasmosis : transmission to the fetus of a prepregnancy maternal infection. *Presse Med* 1995 ; 24 (3) : 179-82.
- 106. Potasmann I., Araujo F.-G., Remington J.-S. Toxoplasma antigens recognized by naturally occurring human antibodies. *J Clin Microbiol* 1986 ; 24 : 1050-4.
- 107. Pratlong F., Boulot P., Villena I., Issert E., Tamby I., Cazenave J., Dedet J.-P. Antenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis : evaluation of the biological parameters in cohort of 286 patients. *Br J Obst Gynaecol* 1996 ; 103 : 552-7.
- 108. Recurt-Carrere M.-P., Bessières M.-H., Séguéla J.-P. Évaluation d'un test ELISA de déter mination des IgM et IgG sériques dans la toxoplasmose humaine. *Med Mal Infect* 1987 ; 10 : 561-7.
- 109. Remington J.-S., Mc Leod R., Desmonts G. *Toxoplasmosis* in Remington J.-S., Klein J.-O. Editors ; *Infectious diseases of the fetus and newborn*, 4[th] éd. Philadelphia, Pennsylvania WB, Saunders 1995 : 140-267.
- 110. Robert F., Ouatas T., Blanche P., Tourte-Schaeffer C., Sicard D., Dupouy-Camet J. Éva- luation rétrospective de la détection de *Toxoplasma gondii* par réaction de polymérase en chaîne chez des patients sidéens. *Presse Médicale* 1996 ; 25 (11) : 541-5.
- 111. Robert-Gangneux F., Gavinet M.-F., Ancelle T., Raymond J., Tourte-Schaeffer C., Dupouy-Camet J. Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis : retrospective study of 110 cases. *J Clin Microbiol* 1999 ; 37 (9) : 2893-8.
- 112. Robert-Gangneux F., Amrein C., Lavarde V., Botterel F., Dupouy-Camet J. Neosynthe sized IgG detected by Western blotting Toxoplasma seropositive heart or lung trans plant recipients. *Transpl Int* 2000 ; 13 : 448-52.
- 113. Robert R., Senet J.-M. Évaluation d'un test au latex sensibilisé par un antigène total pour le dépistage rapide des anticorps antitoxoplasmiques. *Feuill Biol* 1984 ; 25 (140) : 33-6.
- 114. Roberts F., Mc Leod R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitology Today* 1999 ; 15 (2) : 51-7.
- 115. Romand S., Wallon M., Franck J., Thulliez P., Peyron F., Dumon H. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstet Gynecol* 2001 ; 97 (2) : 296-300.

- 116. Rostaing L., Baron E., Fillola O., Roques C., Durand D., Massip P., Lloveras J.-J., Suc J.-P. Toxoplasmosis in two renal transplant recipients : diagnosis by bone marrow aspiration. *Transplant Proc* 1995 ; 27 (2) : 1733-4
- 117. Sabin A.-B., Feldman H.-A. Dyes as microchemical indicators of new immunity phe nomenon affecting a protozoan parasite (Toxoplasma). *Science* 1948 ; 108 : 660-3.
- 118. Séguéla J.-P., Bessières M.-H., Foisy C., Launais B., Pozet S., Recco P., Linas M.-D. Application de la réaction d'hémagglutination indirecte au sérodiagnostic de la toxoplasmose. Utilisation d'un antigène soluble. *Med Mal Infect* 1976 ; 6 (8) : 268-74.
- 119. Séguéla J.-P., Bessières M.-H., Linas M.-D., Recco P., Regnard J., Jaubert M. Toxoplasmose : sérodiagnostic par immuno-enzymologie (ELISA). *Med Mal Infect* 1982 ; 12 (8) : 459-65.
- 120. Senet J.-M., Robert R. Hémagglutination indirecte utilisant un antigène particulaire, appliquée au diagnostic immunologique de la toxoplasmose. *Med Mal Infect* 1974 ; 4 : 21-2.
- 121. Swierczynski B., Bessières M.-H., Cassaing S., Guy S., Oswald I., Séguéla J.-P., Pipy B. Inhibitory activity of anti-IL 4 and anti-IL10 antibodies on *Toxoplasma gondii* proliferation in mouse peritoneal macrophages cocultured with splenocytes from infected mice. *Parasitol Res* 2000 ; 86 : 151-7.
- 122. Tenter A.-M., Heckeroth A.-R., Weiss L.-M. *Toxoplasma gondii* : from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000 ; 30 : 1217-58.
- 123. Thulliez P., Remington J.-S., Sharma S., Desmonts G. Diagnostic du stade évolutif de l'infection toxoplasmique. Une nouvelle réaction d'agglutination. *Presse Med* 1986 ; 15 : 1579.
- 124. Thulliez P., Dutriat P., Saulnier M., Vernes A., Desmonts G. Évaluation de 3 réactifs de détection par immunocapture des IgM spécifiques de la toxoplasmose. *Rev Fr Lab* 1988 ; 169 : 25-31.
- 125. Velin P., Dupont D., Barbot D., Baechler-Sadoul E., Marty P., Gillet J.-Y. Double contamination maternofœtale par le VIH1 et le toxoplasme. *Presse Médicale* 1991 ; 20 (20) : 960.
- 126. Villena I., Chemla C., Foudrinier F., Quereux C., Leroux B., Pinon J.-M. Diagnostic biologique postnatal de la toxoplasmose congénitale. *Presse Médicale* 1997 ; 26 (11) : 520.
- 127. Villena I., Aubert D., Leroux B., Dupouy D., Talmud M., Chemla C., Trenque T., Schmit G., Quereux C., Guenounou M., Pluot M., Bonhomme A., Pinon J.-M. Pyrimethamine-sulfadoxine treatment of congenital toxoplasmosis : follow-up of 78 cases between 1980 and 1997. Reims toxoplasmosis group. *Scand J Infect Dis* 1998 ; 30 (3) : 295-300.
- 128. Voller A., Bidwell D.-E., Bartlette A., Fleck D.-G., Perkins M., Oladehin B. A microplate enzyme immunoassay for Toxoplasma antibody. *J Clin Pathol* 1976 ; 29 : 150-3.
- 129. Wallon M., Dunn D., Slimani D., Girault V., Gay-Andrieu F., Peyron F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis at birth : what is the value of testing for IgM and IgA ? *Eur J Pediatr* 1999 ; 158 (8) : 645-9.
- 130. Wallon M., Kodjikian L., Binquet C., Garweg J., Fleury J., Quantin C., Peyron F. Long-Term Ocular Prognosis in 327 Children With Congenital Toxoplasmosis. *Pediatrics* 2004 ; 113 (6) : 1567-72.

Kyste hydatique à *Echinococcus granulosus*

G. MADULO-LEBLOND, Laboratoire de parasitologie-mycologie médicale, faculté des Sciences pharmaceutiques, université de Paris XI, Châtenay-Malabry.

donne naissance à des capsules proligères qui peuvent « tomber » dans la vésicule (vésicules endogènes). Il est admis, classiquement, que la membrane proligère peut également bourgeonner à l'extérieur de l'hydatide (vésicules exogènes) ;

à l'intérieur

– le liquide hydatique normalement clair et limpide, « eau de roche ». Sa composition chimique comprend des électrolytes, des acides nucléiques, des lipides, des protéines (des enzymes) et des déchets azotés en concentrations variables. Le liquide hydatique contient des antigènes majeurs ayant une grande importance dans le diagnostic biologique (dont l'antigène A plus connu sous le nom d'antigène 5, qui est une lipoprotéine thermolabile) ;
– le sable hydatique : il est constitué par des éléments figurés qui ont sédimenté au fond de la vésicule. Il existe deux types d'éléments :
  - les capsules (ou vésicules) proligères : elles ont bourgeonné à partir de la face interne de la membrane proligère (vésicules endogènes, entre 200 et 500 µm au début) et peuvent s'en détacher,
  - les protoscolex (entre 60 et 100 µm) : ils sont en très grand nombre dans l'hydatide quand les conditions sont favorables. En revanche, ils sont rares ou même absents chez un HI mal adapté. Ces protoscolex peuvent, à leur tour, produire de nouvelles vésicules (« vésicules filles »). Ils correspondent au stade larvaire ultime du parasite. Après s'être dévaginés, ils se transforment en adulte chez l'HD.

    Toutes les vésicules contiennent du liquide hydatique et bourgeonnent des protoscolex.

    Si l'hydatide se rompt, spontanément ou après traumatisme, les protoscolex peuvent bourgeonner et donner de nouvelles formes larvaires responsables de dissémination (hydatidose secondaire).

B. Cycle

Il est hétéroxène (dixène *i.e.* à 2 hôtes).

1. Cycle naturel

Les vers adultes vivent dans l'intestin grêle de l'HD, un canidé domestique, généralement le chien (mais quelquefois chez un canidé sauvage) ; ils y sont très nombreux et en général bien tolérés. Le dernier anneau, gravide (entre 500 et 800 œufs), est éliminé avec les déjections. Ne possédant pas d'orifice de ponte, ce segment ovigère est lysé dans le milieu extérieur et libère de nombreux embryophores. Ces éléments sont très résistants : 1 an entre – 5 °C et + 30 °C, 15 jours dans le formol officinal.
Les embryophores libérés sont ensuite ingérés par des HI réceptifs, des herbivores (essentiellement des moutons mais également des bovins, des caprins, des équidés, des porcins, des camélidés…). Les embryophores ingérés libèrent les embryons hexacanthes qui traversent la paroi digestive et gagnent divers tissus et organes par voie sanguine (poumons et foie le plus fréquemment). Le ou les embryons, une fois fixés, se transforment en hydatide. Chez le mouton, cette larve devient infestante pour le chien en 1 an et le demeure plusieurs années.

II. Clinique

A. Généralités

La parasitose peut être asymptomatique pendant de nombreuses années. Son diagnostic est alors souvent fortuit (imagerie médicale ou autopsie).
Lorsqu'il existe des manifestations cliniques, elles ont un aspect polymorphe en fonction du nombre de larves, de leur volume et de leur localisation (l'hydatide pouvant se développer dans pratiquement tous les tissus).
L'hydatide est dangereuse par son action mécanique (compression d'organes) et son action toxique.
La complication majeure est la fissuration de l'hydatide, voire sa rupture, ce qui, en plus des surinfections, peut être la cause d'un essaimage (donc risque d'hydatidose secondaire) et, plus grave encore dans l'immédiat, d'un choc anaphylactique.

B. Hydatidose hépatique

C'est la localisation la plus fréquente : environ 70 % des cas (le foie est le premier filtre rencontré par l'embryon hexacanthe).
L'hydatidose hépatique se présente souvent comme une hépatomégalie bien tolérée, de découverte fortuite.
Cependant elle se complique fréquemment :
- ouverture dans les voies biliaires pouvant entraîner coliques hépatiques, angiocholite et ictère rétentionnel ;
- fissuration du kyste entraînant une infection subaiguë qui fragilise le kyste ;
- rupture du kyste dramatique à plus ou moins brève échéance ;
- compression des voies biliaires extrahépatiques (ictère rétentionnel), du système porte (hypertension portale).

C. Hydatidose pulmonaire

- Elle est assez fréquente et représente entre 25 % et 30 % des cas ;
- Elle est soit secondaire à une hydatidose hépatique, soit primaire lorsque l'embryon hexacanthe est passé dans le foie sans s'y fixer ;
- Elle est souvent asymptomatique jusqu'à la rupture de l'hydatide dans les bronches qui se manifeste par une « vomique hydatique » (liquide clair souvent mêlé de sang et de fragments de membranes larvaires). Cette rupture peut être responsable de dissémination ;
- Symptomatique, elle s'accompagne de toux, de douleurs thoraciques, d'une dyspnée, parfois d'hémoptysies.

D. Hydatidose splénique

- Elle représente environ 7 % des cas ;
- Elle est souvent secondaire, mais elle peut être primaire ;

B. Diagnostic parasitologique

1. Direct ou de certitude

C'est un examen rarissime puisqu'il ne faut jamais ponctionner une hydatide (risque d'essaimage). Cependant, il arrive que le biologiste ait à observer des éléments parasitaires :
- dans une « vomique hydatique » : présence d'un liquide clair ou contenant du sang, de fragments de membrane blanc nacré, quelquefois de petites vésicules visibles à l'œil nu. L'examen microscopique permet de mettre en évidence des protoscolex et surtout les crochets caractéristiques ;
- dans des fragments de pièces opératoires ou dans les produits obtenus au cours de la technique PAIR, utilisée pour le traitement.

2. Indirect (essentiellement sérologique)

L'activation des mécanismes de l'immunité cellulaire est importante dans l'hydatidose ; des tests mettant en évidence ce type de réponse ont été utilisés (intradermo-réaction de Casoni). Ils se sont révélés peu sensibles, peu spécifiques ; ils ont été abandonnés.

Depuis le *JO* n° 12 de 1995, réactualisé par la version 22 de la TNB, les techniques à utiliser pour la sérologie de l'hydatidose sont précisées :
- pour le dépistage, au moins 2 techniques doivent être mises en œuvre parmi les suivantes : électrosynérèse (ELS), hémagglutination indirecte (HAGG), immunoenzymologie (IEA), immunofluorescence indirecte (IFI) ou double immunodiffusion (IDD) ;
- la confirmation du diagnostic doit utiliser une des techniques suivantes : coélectrosynérèse (COES), immunoélectrophorèse (IELP) ou immunoempreinte (IE) ;
- le suivi, avec examen itératif du sérum ayant servi au dépistage, doit utiliser une des techniques du dépistage.

Dans tous les cas, le biologiste doit indiquer les techniques et les réactifs utilisés, les seuils significatifs, et donner une conclusion.

Bien que cela n'apparaisse, au *JO*, qu'en ce qui concerne la coélectrosynérèse, il est impératif de toujours utiliser des sérums témoins positifs et négatifs lors de la réalisation de ces diverses techniques.

Quelle que soit la technique utilisée (en sachant que les 3 techniques de « confirmation » sont très spécifiques), les résultats sont variables :
- selon la localisation de l'hydatide :
  - environ 90 % de résultats positifs dans les kystes du foie,
  - environ 50 % de résultats positifs dans les kystes du poumon,
  - des réponses très faibles, voire nulles pour les kystes osseux, rénaux, cardiaques ;
- selon la viabilité de l'hydatide :
  - les réponses les plus fortes sont obtenues avec les kystes fissurés ou rompus,
  - les réponses faibles ou nulles sont obtenues avec les kystes calcifiés ou stériles (dépourvus de protoscolex).

Après exérèse, les résultats de la sérologie doivent se négativer entre 12 et 18 mois. Si le taux des anticorps (dans le cas des réactions quantitatives) reste stable ou augmente de façon significative, il faut craindre un essaimage secondaire.

IV. Prophylaxie

Echinococcus granulosus est un complexe comprenant plusieurs « souches », « variétés » ou « sous-espèces ». La prophylaxie sera donc différente selon le type de foyer.

A. Cycles sauvages

Dans le cas de cycles « sauvages », la prophylaxie relève de l'utopie.

B. Cycles domestiques

Dans le cas de cycles « domestiques », deux situations peuvent se présenter :
- les zones dans lesquelles le chien est considéré comme « l'animal fidèle », vivant au contact permanent des êtres humains, adultes et enfants. Dans ces zones, la prophylaxie, bien menée, a permis la diminution de la prévalence de l'hydatidose en Nouvelle-Zélande et son éradication en Islande, à Chypre et à Malte ;
- les zones, en revanche, où le chien est un animal rejeté des humains, ce qui implique des cycles chez les chiens errants.

Dans ces deux cas, il faut :
- une bonne éducation sanitaire des populations : laver les mains, laver les fruits et légumes ; ne pas caresser de chiens inconnus, se méfier des bacs à sable des parcs et jardins ;
- en zone d'endémie, abattre les chiens errants ;
- interdire l'entrée des abattoirs aux chiens ;
- interdire les abattages artisanaux ou privés de moutons et autres HI ;
- en zone d'endémie, bien enterrer les viscères parasités des HI ;
- traiter les chiens domestiques parasités par 5 mg/kg de praziquantel. Les chiens sont enfermés pendant au moins 24 heures et leurs déjections sont brûlées. Ces traitements doivent être renouvelés régulièrement (toutes les 4 ou 6 semaines). En particulier, il est recommandé de vermifuger les chiens de bergers avant le départ et au retour d'alpage.

V. Traitement

A. Le traitement de choix est chirurgical

Mais il n'est pas toujours réalisable (kystes inaccessibles, kystes multiples).

B. Le traitement médical

On utilise l'albendazole (Eskazole®, comprimé de 400 mg, liste II, réservé aux hôpitaux, à utiliser en milieu hospitalier).

L'homme joue donc le rôle d'hôte intermédiaire. L'hydatide peut se développer, lentement, dans à peu près tous les tissus de l'homme. Elle est dangereuse par ses actions mécanique et toxique.
Chez l'homme, l'hydatidose peut rester longtemps asymptomatique. Lorsque les manifestations cliniques apparaissent, elles varient en fonction du nombre des larves, de leur volume et de leur localisation. Les localisations hépatiques et pulmonaires sont les plus fréquentes.
Le diagnostic biologique repose essentiellement sur la sérologie. Le biologiste doit utiliser au moins 2 techniques pour le dépistage et une autre pour la confirmation. Après exérèse, les résultats sérologiques doivent se négativer entre 12 et 18 mois.
La prophylaxie, utopique dans les foyers où se déroulent des cycles « sauvages », peut, quand elle est bien menée dans les foyers « franchement domestiques », entraîner une diminution de la prévalence de la parasitose, voire son éradication. Elle repose sur l'éducation sanitaire des populations, le traitement des chiens domestiques parasités, l'interdiction de la présence de chiens aux alentours et dans les abattoirs.
Quand il est possible, le traitement de choix est chirurgical. La technique PAIR est même quelquefois suffisante. Le traitement médical, souvent associé au traitement chirurgical, utilise l'albendazole.

Pour en savoir plus

- ANOFEL. Campus numérique de parasitologie-mycologie : http://www.uvp5.univ-paris5.fr/campus%2dparasitologie
- Banque de données sur le médicament : http://www.theriaque.org
- Beugnet F., Bourdoiseau G. et Dang H. « Abrégé de parasitologie clinique des carnivores domestiques », Vol I. *Parasitoses digestives* ; Kalianxis Clichy, 2004.
- Bronstein J.-A. et Klotz F. Cestodoses larvaires. Maladies infectieuses. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), 2, 2005 : 59-83.
- Centers for Disease Control and Prevention. Division of Parasitic Diseases. Laboratory Identification of Parasites of Public Health concern : *http://www.dpd.cdc.gov/dpdx*
- Remy-Kristensen A. et Pesson B. « Mécanismes d'action des antiparasitaires » in *Pharmacologie moléculaire*, Landry Y. et Gies J.-P. Arnette Paris, 2ᵉ éd., 1993 : 695-725.

Épidémiologie, prévention et hygiène

L'épidémiologie étudie la fréquence et la répartition dans le temps et dans l'espace des problèmes de santé dans des populations humaines, ainsi que le rôle des facteurs qui les déterminent.
L'objet d'investigation de l'épidémiologie est tout ce qui a trait à la santé d'une population : les décès (la mortalité), les maladies (la morbidité), les conséquences des maladies (incapacités, handicaps) et les éléments de bonne santé (performances, adaptation).
En revanche, l'épidémiologie n'a pas habituellement les moyens d'étudier les mécanismes qui expliquent le déclenchement des problèmes de santé. Pour ce faire, elle doit collaborer avec d'autres spécialités et notamment les sciences sociales et biomédicales.
Selon les questions posées et les méthodes utilisées pour y répondre, trois branches de l'épidémiologie se distinguent aujourd'hui :
- *l'épidémiologie descriptive : elle étudie la fréquence et la répartition des problèmes de santé dans une population en établissant les taux entre sujets atteints par une condition et le reste de la population. Elle n'établit pas de lien de cause à effet mais se contente de décrire des phénomènes de santé ;*
- *l'épidémiologie explicative (analytique, étiologique) : elle étudie le rôle de l'exposition à des facteurs susceptibles d'intervenir dans l'apparition d'affection. Elle procède par comparaisons des taux. Elle établit des liens de cause à effet ou simplement met en évidence des associations entre facteurs de risque et maladies ;*
- *l'épidémiologie évaluative : elle évalue les résultats d'actions de santé dans la collectivité en comparant, par exemple, le bénéfice d'une action sanitaire au sein d'un groupe avec un groupe n'en bénéficiant pas.*

I. Épidémiologie descriptive

L'épidémiologie descriptive consiste à mesurer l'importance des problèmes de santé dans la population. Elle étudie la distribution des affections au sein d'une ou plusieurs populations.
Elle établit des taux de sujets atteints par une condition dans une population en fonction des caractéristiques des personnes, de la répartition géographique et de l'évolution dans le temps (par exemple, fréquence des décès dus à une maladie). Enfin, elle étudie la variation des taux en fonction des phénomènes susceptibles de les influencer comme l'espace (géographie), le temps et les caractéristiques des personnes (sexe, âge).

A. Les indicateurs de santé

La connaissance de l'état de santé d'une population s'exprime à l'aide d'indicateurs de santé.
Certains indicateurs concernent la durée moyenne de vie à un âge donné, ou espérance de vie. C'est le nombre moyen d'années de vie qu'une personne peut espérer vivre, qui, sans précision, est considéré à la naissance, sinon à l'âge précisé.
D'autres indicateurs, les taux, reflètent la fréquence d'un événement :

$$\text{TAUX} = \frac{\text{Cas recensés}}{\text{Effectif population}} \times 10^3$$

Les principaux taux sont les suivants :

- La mortalité
  Les cas recensés sont le nombre de décès survenus dans la population étudiée durant la période considérée ;
- La morbidité
  Il s'agit du nombre total de malades dans une population, maladies entraînant ou non la mort ;
- L'incidence
  C'est le nombre de nouveaux cas d'une maladie, apparus dans la population durant la période considérée. L'incidence renseigne sur les conditions de survenue de cette maladie.
  Le taux d'attaque est un cas particulier. Il s'agit du nombre de nouveaux cas d'une maladie apparaissant sur une période donnée, et rapporté aux sujets susceptibles d'être atteints (par exemple, intoxication, irradiation, infection nosocomiale) ;
- La prévalence
  Il s'agit du nombre global de cas d'une maladie. Il est défini, soit à un instant donné (prévalence instantanée), soit sur une période donnée. Ici, on s'intéresse au nombre de personnes souffrant d'une condition défavorable.

L'étude des phénomènes est souvent affinée grâce au calcul des taux spécifiques de mortalité ou de morbidité en fonction des maladies, des professions ou d'autres caractéristiques.
La difficulté de l'épidémiologie réside dans l'interprétation des taux car ceux-ci reflètent des phénomènes divers et conjugués.
Par exemple, les taux globaux et spécifiques sont très influencés par la structure d'âge de la population considérée. Or, il est nécessaire de définir cette structure d'âge si l'on veut pouvoir juger de l'existence d'une différence entre deux populations, indépendamment de leur structure d'âge.
Afin d'éliminer l'effet des différences entre populations à comparer pour une variation considérée (âge), il existe des méthodes de standardisation :

- Méthodes de standardisation directe
  Elles permettent de comparer deux populations de grandes tailles en définissant une population de référence. On calcule le taux que l'on s'attendrait à trouver dans les populations étudiées si elles avaient toutes la même composition selon la variable à ajuster. On parle alors de taux standardisés (sur l'âge par exemple). Généralement, en cas de comparaison de deux populations, l'une d'elles sert de population de référence ;
- Méthodes de standardisation indirecte
  Il s'agit de comparer le nombre de cas observés dans une petite population, et le nombre de cas attendus si on lui applique les taux existant dans chaque classe d'une grande population (prise comme population de référence). On calcule donc le nombre de décès attendus dans la petite population si elle mourrait comme dans la grande. Les taux obtenus sont appelés des rapports standardisés de mortalité (SMR : *Standardized Mortality Ratio*) ou d'incidence (SIR : *Standardized Incidence Ratio*).

B. Sources de données sur la santé d'une population

1. Sources de données permanentes

Pour décrire l'état de santé d'une population, il est important de connaître les caractéristiques des personnes.
L'Insee (Institut national de la statistique et des études économiques) est un organisme d'État ayant en charge les données démographiques françaises : il publie régulièrement des données selon les critères géo-administratifs (naissances, décès...) et sociodémographiques (sexe, catégorie socioprofessionnelle...).
Dans le cas où la population étudiée est définie selon d'autres critères (socioprofessionnels...), les sources de données sont plus diverses (service du personnel, services publics...).
Lorsque les données n'existent pas, on est alors amené à réaliser une enquête auprès de la population concernée.
Les numérateurs des taux sont constitués par les effectifs des cas présentant le problème de santé considéré. Les sources de données varient selon la nature du problème de santé.
Pour la mortalité, en France, l'Inserm (Institut national de la santé et de la recherche médicale) a la charge de collecter le nombre de décès, et l'Insee les causes de ces décès (confidentialité). Au plan international, c'est l'Organisation mondiale de la santé (OMS) qui s'en charge et qui établit une Classification statistique internationale des maladies et des problèmes de santé connexes (CIM).
En revanche, il n'existe pas de recueil exhaustif et permanent pour la morbidité. L'incidence véritable d'une maladie sur un territoire ne peut être connue que grâce aux rares registres de maladies qui existent ou aux données d'origine médico-administrative.
La difficulté d'obtention de données sur la morbidité entraîne la nécessité de réaliser des enquêtes spécifiques dans la population.

2. Enquêtes spécifiques dans la population

Il existe plusieurs types d'enquête spécifique.

a) Les enquêtes transversales ou dites de prévalence

Elles permettent de recenser les effectifs concernés à un moment donné. Il s'agit d'une observation ponctuelle de la population qui renseigne sur la prévalence mais pas sur l'incidence de la maladie. Les enquêtes transversales exhaustives, parfois nécessaires, sont rares car très lourdes.
Les enquêtes longitudinales qui estiment le nombre de nouveaux cas d'une maladie dans une population pendant une période donnée permettent de renseigner sur le taux d'incidence.

b) Les enquêtes par sondage

Elles consistent à observer un échantillon représentatif de la population, mais beaucoup plus petit qu'elle. La représentativité est obtenue par tirage au sort (sondage aléatoire et échantillon aléatoire). Le phénomène de fluctuation d'échantillonnage, dû au tirage au sort, est contrôlé grâce aux méthodes statistiques d'analyse d'échantillons aléatoires.

Exemple : cas de l'exposition à un produit X et survenue d'un cancer broncho-pulmonaire. Cette association peut être en fait liée au tabac (facteur de confusion), si le tabagisme est plus élevé dans la population exposée au produit X étudié que dans la population non exposée.
Il existe des méthodes (sélection de sujets et de tests statistiques) qui permettent de prendre en compte un ou plusieurs facteurs de confusion et de les neutraliser. L'étude bibliographique permet de repérer les facteurs de confusion potentiels à l'avance.
Cependant, il peut toujours exister un facteur de confusion inconnu. Pour affirmer une relation causale, il faudrait faire une enquête expérimentale en disposant de groupes absolument comparables ; malheureusement, dans la pratique, l'enquêteur se trouve le plus souvent dans une situation d'observation.
Il faut donc s'entourer d'un certain nombre de garanties pour soutenir la thèse d'une relation de causalité, à savoir :
- la séquence dans le temps : l'exposition au facteur précède l'apparition de la maladie,
- la constance et la reproductibilité de l'association,
- la force de l'association statistique,
- l'existence d'une relation dose-effet,
- l'effet d'une intervention supprimant le facteur de risque (un des meilleurs arguments de causalité lorsqu'il peut être observé),
- la cohérence avec les connaissances actuelles.

B. Méthodes d'enquêtes à visée explicative

Les enquêtes épidémiologiques sont des observations organisées d'une population dont l'objectif est de recueillir les informations nécessaires pour établir les risques relatifs.
Une étude épidémiologique à visée explicative consiste à vérifier l'hypothèse de relation causale entre exposition à un facteur de risque et survenue d'un problème de santé.
Selon la nature du problème étudié et le contexte dans lequel l'étude se déroule, les modèles d'investigations peuvent différer.
Cependant, la méthode générale est vague : il s'agit de comparer des groupes de sujets diversement exposés au facteur de risque supposé, et dont certains sont atteints de la maladie étudiée et d'autres non.
Lors de ces enquêtes, les données sont recueillies au niveau des individus afin d'améliorer leur qualité et leur quantité (détermination et élimination des facteurs de confusion).
Pour vérifier une relation de causalité entre un facteur de risque et une maladie, la meilleure méthode est de comparer l'incidence de cette maladie dans des groupes de sujets diversement exposés au facteur. La modification de l'incidence de la maladie est évaluée grâce à un indice épidémiologique : le risque relatif.
Le risque relatif est le rapport de l'incidence dans le groupe exposé et de l'incidence dans le groupe non exposé. Il représente la mesure du rôle étiologique du facteur de risque.

1. L'enquête exposés-non exposés

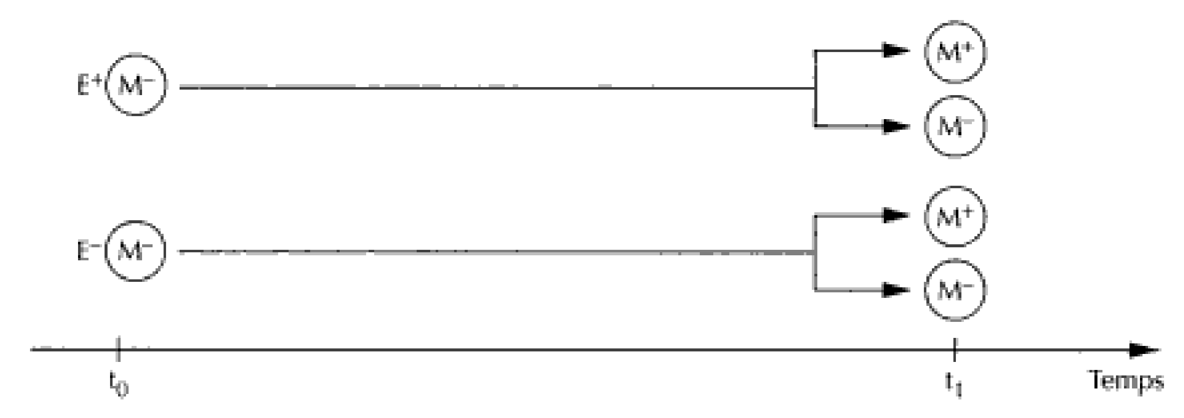
Le principe de l'enquête exposés-non exposés est le suivant : 2 groupes sont constitués, un groupe exposé au facteur de risque et un groupe non exposé (*fig. 1*). Puis, les groupes sont surveillés pendant une période d'observation au cours de laquelle on enregistre l'apparition de la maladie. L'enquête comparera la proportion de sujets malades dans les 2 groupes, exposés-non exposés. On parle aussi d'étude cohorte prospective.

Dans ce type d'enquête, le facteur d'exposition est dit contrôlé alors que la maladie est le facteur aléatoire.

Les modifications d'exposition au facteur ainsi que l'incidence de la maladie sont mesurées pendant toute la durée de la période d'observation.

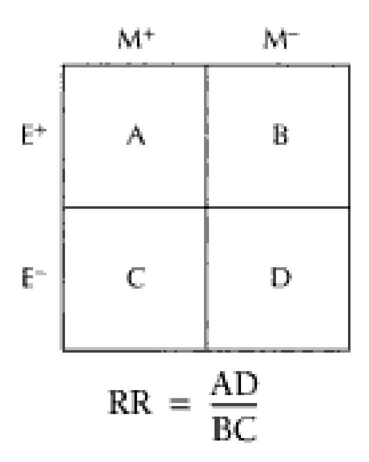
À la fin de la période, les données recueillies permettent de calculer les risques relatifs et de faire l'estimation de l'incidence de la maladie dans la population, dans la mesure où les échantillons de sujets sont représentatifs (*fig. 2*).

Parmi les sujets, tous non-malades (M^-) au temps t_0, certains sont exposés au facteur du risque étudié (E^+) et certains ne sont pas exposés (E^-). Dans chacun des groupes, certains deviendront malades (M^+) au temps t_1.



M^+ signifie *malades* (c'est-à-dire les cas incidents pendant la période d'observation)
M^- signifie *non malades* (c'est-à-dire les sujets indemnes à la fin de la période d'observation)
E^+ signifie *exposés au facteur de risque*
E^- signifie *non exposés au facteur de risque*

Figure 1. Principe de l'enquête exposés-non exposés



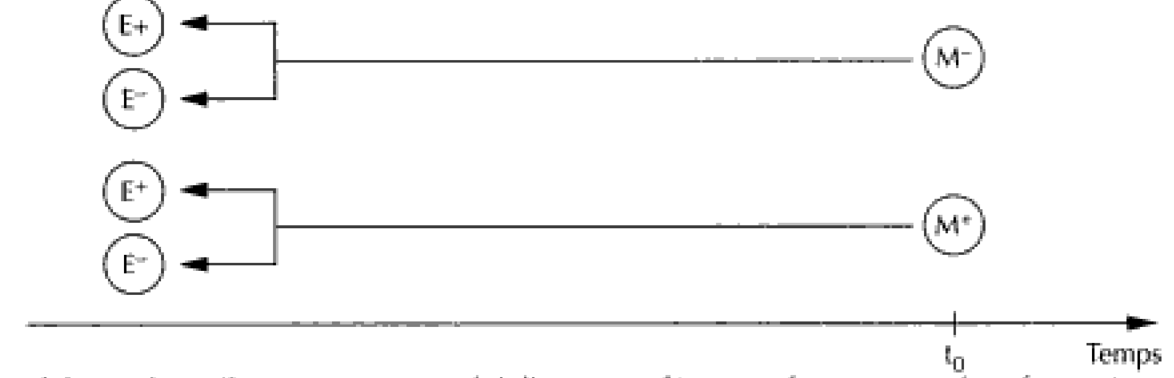
$$RR = \frac{AD}{BC}$$

Figure 2. Principe de calcul du risque relatif (RR)

L'avantage de ce type d'enquête est de pouvoir calculer directement les risques relatifs qui traduisent l'association existant entre la pathologie et le facteur de risque étudié. Ses inconvénients sont qu'il s'agit d'enquêtes prospectives, avec parfois des délais d'étude et des coûts importants. Ces études exposent à un grand nombre de sujets perdus de vue et sont non applicables aux pathologies rares.

2. L'enquête cas-témoins

Elle est utilisée lorsque l'enquête exposés-non exposés est irréalisable (coûts et délais trop importants), bien que théoriquement moins adaptée à l'analyse d'une relation causale.
Le principe de l'enquête cas-témoins est de sélectionner un groupe de sujets atteints de la maladie étudiée (les cas), et un (ou plusieurs) groupe(s) de sujets indemnes de cette maladie (les témoins). Puis, l'exposition aux facteurs de risque et aux facteurs de confusion éventuels est recherchée dans le passé de chaque sujet de l'enquête (*fig. 3*). Dans ce type d'enquête, la maladie est le facteur contrôlé et l'exposition le facteur aléatoire.



Le schéma suivant (à comparer avec celui d'une enquête exposés-non exposés : *cf. supra*) représente la situation pour une enquête cas-témoins.

Figure 3. Principe de l'enquête cas-témoins

L'épidémiologiste fixe l'effectif des groupes de cas et de témoins pour avoir une efficacité maximale des tests statistiques utilisés. Mais dans ces conditions, l'estimation de l'incidence des exposés et des non exposés au facteur est impossible.
L'enquête cas-témoins concerne souvent des maladies rares pour lesquelles il est difficile d'effectuer un suivi long et comportant un risque élevé de perdus de vue. Néanmoins, pour des maladies rares et des groupes de cas et de témoins représentatifs, il est possible de calculer un risque relatif estimé, le RRE (*odds-ratio*).
Le RRE estime l'augmentation de la probabilité d'avoir la maladie après exposition au facteur de risque, en comparant la fréquence de l'exposition chez les malades (les cas) et les non-malades (les témoins) (*fig. 4*).
Parmi les sujets choisis au temps t_0 de l'étude pour être déjà malades (M^+) ou indemnes (M^-), on cherche dans leur passé ceux qui ont été exposés au facteur de risque (E^+) et ceux qui ne l'ont pas été (E^-).
Les sujets exposés ont une probabilité d'avoir la maladie qui est RRE fois celle des non exposés.

	M⁺ (cas)	M⁻ (témoins)
E⁺	A	B
E⁻	C	D

Les cases ont la même signification que dans l'enquête exposés-non exposés et la formule du risque relatif estimé (RRE) est identique à celle du risque relatif :

$$RRE = \frac{AD}{BC}$$

Figure 4. Principe de calcul du risque relatif estimé

Bien que théoriquement mal adaptée au jugement de causalité, l'enquête cas-témoins permet d'obtenir rapidement des réponses aux questions posées, et ce à moindre coût car les groupes sont de faibles effectifs.
Cependant, il est impossible de connaître l'incidence d'une maladie, et les nombreux biais qui existent dans ces enquêtes rendent les résultats moins fiables que ceux des enquêtes exposés-non exposés.

III. Les biais en épidémiologie

A. Définition

Un biais se définit comme une erreur systématique qui s'introduit dans une enquête épidémiologique. Il tend à produire une estimation fausse, supérieure ou inférieure à la vraie valeur du paramètre étudié du paramètre suivi (fréquence d'une maladie dans la population, risque relatif).
L'épidémiologiste peut commettre d'autres types d'erreurs (calculs, interprétations statistiques).
Il faut donc distinguer les biais, erreurs systématiques qui vont entraîner une non-validité des résultats, des erreurs aléatoires qui sont dues au hasard.
Les biais peuvent être liés à toutes les personnes intervenant dans l'étude et peuvent être introduits directement ou indirectement, délibérément ou non.
Ils peuvent être liés à une revue de littérature-santé non exhaustive, un mauvais recueil d'informations, une sélection non adéquate des sujets…

B. Les biais de sélection

Ce sont tous les biais qui conduisent à ce que les sujets observés dans l'enquête ne constituent pas un groupe représentatif de la population étudiée.
Les principaux sont les suivants :
- *le biais de recrutement* : il apparaît lorsque les sujets entrent dans l'étude avec des probabilités différentes en fonction de certaines caractéristiques qui peuvent être

Contamination bactérienne, virale et parasitaire des eaux

D. RICHARD, Pharmacie, centre hospitalier Henri Laborit, Poitiers.

L'expression clinique classique des pathologies liées à l'eau d'usage courant concerne les diarrhées, qu'il s'agisse d'infections virales (rotavirus, adénovirus, etc.), d'infections bactériennes (par des salmonelles, des shigelles, le vibrion cholérique, etc.) ou encore parasitaires (amiboses, giardoses, ascaridioses, trichocéphaloses, etc.) mais, à l'hôpital, il s'agit de pathologies beaucoup plus variées, respiratoires notamment, compte tenu des modes d'usage de l'eau, de la plus grande richesse des micro-organismes présents et de la vulnérabilité des patients hospitalisés.

I. Les agents contaminants

A. Contamination bactérienne

Une eau contaminée, même faiblement, par des germes fécaux, n'est pas consommable, mais peut être utilisée pour des travaux domestiques ou la culture. Lors d'une contamination, il est généralement aisé d'en retrouver les sources :
- puits non étanches en surface ;
- fosses septiques à proximité du puits ;
- présence d'animaux autour de la source ;
- présence d'ordures, de fumiers, etc., autour de la source ;
- vétusté des canalisations ;
- conditions météorologiques extrêmes.

Le dénombrement des bactéries pathogènes dans les eaux est difficile et imprécis en raison de leur présence aléatoire et de leur faible nombre s'ils sont présents. Cela pose des problèmes importants, tant au niveau de l'échantillonnage que des méthodes de laboratoire elles-mêmes. C'est la raison pour laquelle le concept de germes dits « indicateurs » de pollution a été créé. Il est destiné à pallier les difficultés de fonder une surveillance sur les germes pathogènes. Les bactéries indicatrices ont pour intérêt de signaler l'existence d'une pollution de l'eau par des excréments humains ou animaux ou toute autre source potentielle de pathogènes.
Les normes bactériologiques sont variables suivant les types d'eau.

1. Limite de qualité des eaux destinées à la consommation humaine

L'eau ne doit pas contenir d'organismes pathogènes et en particulier :
- de salmonelles dans 5 litres d'eau prélevée ;
- de staphylocoques pathogènes dans 100 mL d'eau prélevée ;
- de bactériophages fécaux dans 50 mL d'eau prélevée et d'entérovirus dans un volume ramené à 10 litres d'eau prélevée ;
- 95 % au moins des échantillons prélevés ne doivent pas contenir de coliformes dans 100 mL d'eau ;
- ne doit pas contenir plus d'une spore de bactéries anaérobies sulfito-réductrice par 20 mL d'eau prélevée ;
- lorsque les eaux sont livrées sous forme conditionnée, le dénombrement des bactéries aérobies, revivifiables à 37 °C et après 24 heures, doit être inférieur ou égal à 20 par mL d'eau prélevée ; à 22 °C et après 72 heures il doit être inférieur ou

- *Reoviridae* : réovirus et rotavirus ;
- *Adenoviridae* : adénovirus humains ;
- *Parvoviridae parvovirus* ;
- *Papoviridae* : papillomavirus humains.

Si le titre viral est suffisant (eaux usées), on peut procéder à l'inoculation directe. Mais la concentration virale de l'environnement est très variable (de 0 à plus de 100 000 virions par litre) et il faut donc dans certains cas concentrer l'échantillon. Diverses techniques sont proposées, mais l'adsorption sur un support, suivie d'une élution par un faible volume de liquide semblent la plus fréquemment utilisée de toutes les étapes. L'éluat est ensuite concentré et le virus mis en évidence sur au moins deux types de systèmes cellulaires, par inoculation à des animaux, par microscopie électronique ou par des techniques immunologiques.

3. Mode d'infection

a) Eau de boisson polluée

Les épidémies sont la conséquence directe d'une insuffisance de traitement des eaux ou d'une contamination secondaire (hépatite A, gastro-entérite virale).

b) Coquillages cultivés dans des eaux polluées

Les mollusques peuvent être directement contaminés par l'eau de mer lors de sa filtration physiologique. Des coquillages satisfaisant aux normes d'hygiène alimentaire ont ainsi été reconnus porteurs d'entérovirus et de réovirus. En pratique, seules l'hépatite A et les gastro-entérites à parvovirus peuvent induire des épidémies lorsque les mollusques sont insuffisamment cuits.

Note : il est à remarquer que, contrairement à une opinion répandue, l'eau de mer n'est pas dépourvue de contamination microbienne. Les germes y sont certes plus rares que dans les eaux douces, et ce d'autant que l'on est plus au large, mais on observe une crypto-croissance de germes variés entraînés par les courants : streptocoques fécaux, quelques entérobactéries, *Mycobacterium* et, en ce qui nous concerne ici, entérovirus. Près du littoral, l'abondance des matières organiques permet la croissance de *Salmonella paratyphi B*. Les germes sont volontiers fixés sur des particules colloïdales et du plancton mort.

c) Baignades

La fréquentation d'une piscine peut être mise en cause lors de l'apparition de verrues cutanées plantaires dues au papillomavirus. Cette pathologie toucherait 10 % des baigneurs assidus. Ce sont le sol et le matériel qui sont surtout en cause. D'autres virus peuvent être responsables d'infections comme le virus de l'hépatite A, les entérovirus, et les adénovirus (conjonctivites). Pour ces virus, c'est l'eau qui est incriminée. En revanche, les piscines ne jouent aucun rôle dans la transmission de l'hépatite virale B ou C et du VIH.

Globalement, la quantité de virus contenue par les diverses eaux susceptibles de contaminer l'homme demeure faible. Il est néanmoins difficile de quantifier exactement les pathologies qui leur sont dues car leur symptomatologie demeure souvent fruste.

- s'agissant de l'eau de boisson, la plupart des projets d'assainissement mis en place dans les pays en voie de développement visent à garantir idéalement entre 15 et 20 litres d'eau par jour et par personne.

Il s'agit dans un premier temps de préciser les causes de pollution des points d'eau traditionnels et, notamment, l'origine des infiltrations contaminantes par le biais d'enquêtes sanitaires. Les manœuvres de désinfection ponctuelle se révèlent la plupart du temps inefficaces.

Il s'agit aussi d'évaluer la fiabilité des structures de transport et de stockage de l'eau : le manque de propreté des surfaces ou le contact avec les mains représentent autant de causes de contamination. La seule mesure radicale permettant de limiter cette pollution domestique des eaux consiste à garantir un taux de chlore résiduel suffisant dans l'eau consommée.

Les aliments constituent également un mode de contamination majeur et il est impératif de surveiller leurs conditions de préparation, de lavage notamment, leurs conditions de récolte, de vente, de stockage. On évitera de cuisiner à même le sol, on prévoira des rangements adéquats pour la vaisselle, on chassera les animaux proches…

B. L'eau de distribution publique

La qualité de l'eau destinée à la consommation humaine a fait l'objet de nombreux décrets dans les dernières années. Le décret 89-3 du 3 janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles, a été modifié et complété par décret en avril 1990 et en mars 1991.

Rappelons que l'eau potable est aussi inscrite à la Pharmacopée française (X[e] édition) qui précise qu'il s'agit d'« une eau destinée à l'alimentation humaine, agréable à consommer, et qui n'est pas susceptible de porter atteinte à la santé ».

Les risques hydriques sont chimiques et microbiologiques et, en ce qui nous concerne ici, le risque sera donc essentiellement lié à :

- des bactéries : vibrion cholérique, salmonelles, shigelles, *Campylobacter*, etc. ;
- des virus : poliovirus, hépatite A, coxsackies, etc. ;
- des parasites : *Giardia*, *Lamblia*, amibes ;
- des levures et des champignons.

De façon moins classique, on observe aussi des pathologies respiratoires (légionelloses, mycoses pulmonaires, affections ORL variées), sans même évoquer leptospiroses, méningo-encéphalites amibiennes, dermatomycoses, candidoses, cystocercoses animales.

Ces eaux d'alimentation sont également définies par des directives européennes (75-440 du 16 juin 1975, 79-869 du 9 octobre 1979, 80-778 du 15 juillet 1980) et, bien sûr, par le Code de la santé publique.

Les contrôles prévus ne garantissent évidemment ni la stérilité de l'eau (simples normes au-delà desquelles l'eau sera considérée comme non potable), ni la possibilité de voir proliférer dans les circuits de distribution des germes, non dangereux chez l'adulte sain, mais susceptibles de le devenir chez des sujets débilités, ou des germes rares potentiellement pathogènes (*Legionella*, *Pseudomonas æruginosa*, *Aeromonas hydrophila*).

- les analyses microbiologiques des eaux traitées par des biguanides doivent être complétées par la recherche de *Pseudomonas æruginosa* et le dénombrement bactérien à 22 °C.

Rappelons que l'eau d'une piscine doit être désinfectée, désinfectante, limpide et « confortable » (pas d'odeur ni d'irritation pour les yeux). La conformité des résultats physico-chimiques est une garantie de bonne qualité bactériologique.

L'essentiel de la question

La maîtrise de la qualité de l'eau constitue toujours une difficulté, aussi bien en ce qui concerne ses paramètres chimiques qu'en ce qui concerne ses paramètres biologiques. Ce problème est particulièrement important au sein des établissements de santé où les contaminations ayant pour origine l'eau représentent un risque majeur (légionelloses, etc.). Il importe de connaître les principaux micro-organismes à l'origine d'une contamination des eaux (légionelles, virus de l'hépatite A, *Pneumocystis*, etc.), de pouvoir préciser les liens entre qualité des eaux à l'hôpital et survenue d'infections nosocomiales et de connaître les techniques essentielles mises en œuvre pour prévenir les risques.

Pour en savoir plus

- Becker A., Lebas M. « L'eau à l'hôpital » in *Hygiène hospitalière pratique*, APHIF EM internationales, 2e éd. Paris, 1988 : 475-504.
- *Eaux des établissements de santé : qualité de l'eau des réseaux intérieurs*. Laboratoire ASTA Médica, 2000, 1-62.
- Deleuze L. *et al*. Les eaux pharmaceutiques. *Hygiènes* 1998, VI (6) : 395-7.
- Hartemann P. Concours médical 1999, 121-10 : 731-4.
- *Guide technique de l'eau dans les établissements de santé (2005)*. Disponible en ligne : www.sante-gouv.fr (rubrique « thèmes » puis « eau »).
- *Catégories d'eau dans les établissements de santé (2006)*. Disponible en ligne : www.cclin-sudest.chu-lyon.fr.

Le risque infectieux nosocomial dans les établissements de santé

D. RICHARD, Pharmacie, centre hospitalier Henri Laborit, Poitiers.

Ce n'est qu'à la fin du XVIIIe siècle que l'on a pris conscience des dangers que ne manquait pas d'induire la cohabitation de malades infectés dans une même salle, voire, souvent, dans un même lit. S'y ajoutait également une contamination hors des murs de l'hôpital du fait de la revente des effets vestimentaires des patients décédés, sans nettoyage. La contagion gagnait malades, blessés, indigents hébergés à l'hospice, infirmières comme médecins. Accouchements et interventions chirurgicales étaient, du fait de l'absence de stérilisation et de règles d'asepsie, suivis en règle ou presque d'infections. Ainsi, en 1788, le médecin Tenon estimait que 99 % des femmes qui accouchaient à l'Hôtel Dieu de Paris décédaient d'une fièvre puerpérale (à l'époque, les sages-femmes ne se lavaient pas les mains entre les accouchements).
Au milieu du XIXe siècle, l'américain Holmes et l'autrichien Semmelweis, avant la découverte des bactéries, proposèrent une méthode efficace pour prévenir la contamination puerpérale : le lavage des mains avant chaque accouchement par une solution d'eau de Javel ou de chlorure de chaux. En 1865, un chirurgien anglais, Lister, proposa de traiter les plaies opérées par application d'acide phénique, puis étendit sa technique aux mains du chirurgien, aux instruments et à la peau saine du patient autour du site de l'intervention. En 1888, il généralisa le principe de l'autoclavage du matériel. Mais il fallut attendre 1907 pour qu'une synthèse des travaux sur l'hygiène hospitalière soit pour la première fois éditée en France.
La découverte des antibiotiques à la fin des années 1930 (sulfamides) n'apporta qu'un espoir temporaire de supprimer le risque infectieux, car les premières souches résistantes ne tardèrent pas à être isolées. De fait, dès les années 1960, les hygiénistes prirent conscience de la nécessité de surveiller et de prévenir d'une façon rigoureuse les pathologies infectieuses contractées à l'occasion de soins ou d'un séjour hospitalier : les infections nosocomiales.

I. L'infection nosocomiale

L'infection nosocomiale est une maladie infectieuse (bactérienne, fongique, parasitaire, virale ou induite par des prions) cliniquement ou microbiologiquement identifiable, contractée dans une structure de soins. Elle peut concerner un patient hospitalisé ou ayant subi des soins ou examens en ambulatoire. Lorsque l'état infectieux du patient à l'admission est inconnu, l'infection est réputée nosocomiale si elle apparaît après un délai de 48 heures d'hospitalisation.
On distingue plusieurs types d'infections nosocomiales relevant de modes de transmission différents :
- Infections « endogènes » : le malade est infecté par ses propres germes, à la faveur d'un acte médical invasif et/ou en raison d'une vulnérabilité particulière (immunodépression, etc.) ;
- Infections « exogènes » : elles peuvent être croisées (transmises d'un patient à un autre), induites par des germes portés par le personnel médical ou encore liées à une contamination par l'environnement hospitalier (eau, air, matériel, alimentation, etc.).

L'infection nosocomiale constitue actuellement un problème majeur de santé publique, de par sa fréquence, sa morbidité et la surmortalité qu'elle entraîne ainsi que par le coût de prise en charge. C'est une préoccupation à l'échelle européenne :

2. Augmentation des résistances aux antibiotiques

L'augmentation des résistances aux antibiotiques constitue un problème crucial :

- De 20 à 30 % des *Klebsiella* résistent aux céphalosporines de troisième génération ;
- 60 % des *Pseudomonas aeruginosa* résistent à la gentamicine ;
- 20 à 30 % des souches responsables d'infections nosocomiales ont développé une résistance à l'imipénème, à la ceftazidime, à la ciprofloxacine ou aux uréïdopénicillines ;
- Une nouvelle « génération » de staphylocoques dorés émerge, résistante à la méticilline, mais exprimant un gène nouveau codant la production d'une toxine qui nécrose les tissus (PVL) et provoquant chez les enfants des pneumopathies nécrosantes. Aux États-Unis, environ 50 % des souches de staphylocoques portent le PVL, contre 1 % à 3 % en France ;
- La proportion de pneumocoques résistants à la pénicilline G et à l'érythromycine était respectivement de 38 % et 42 % en 2004 en France, contre une moyenne européenne de 10 % et 18 % ;
- Des épidémies hospitalières à entérocoques résistants à la vancomycine sont observées depuis 2003, la résistance ayant été acquise par ce germe du fait de l'utilisation par la filière de la volaille d'un promoteur de croissance antibiotique (avoparcine) qui a permis à la résistance de passer des staphylocoques aux entérocoques.

  Cette émergence massive de souches résistantes doit inciter à développer des mesures prophylactiques limitant la transmission croisée des résistances (isolement plus strict des patients, respect absolu des règles d'hygiène en y incluant l'ensemble des personnels : brancardiers, kinésithérapeutes, etc.).

3. Importance des bacilles à Gram négatif

En principe, les bacilles à Gram négatif sont tous potentiellement susceptibles de coloniser ou d'infecter des lésions cutanéomuqueuses ainsi que la plupart des dispositifs médicaux. Toutes les surfaces de travail ainsi que l'eau, même distillée, peuvent être aussi contaminées, notamment par des *Serratia* ou des *Acinetobacter*. Ces germes sont d'ailleurs capables de devenir résistants à la polyvidone iodée ou à la chlorhexidine.

Les bacilles à Gram négatif se comportent comme des opportunistes. Ils infectent donc une lésion pré-existante (uropathies chroniques, bronchopathies, mucoviscidose, plaies cutanées et escarres, sujets sous ventilation, sujets transfusés – bactériémie transfusionnelles –) pour peu que le sujet soit immunodéprimé. La colonisation, initialement locale, se généralise rapidement, avec bactériémie et essaimage viscéral. Ce problème est d'autant plus important que les infections nosocomiales à bacilles à Gram négatif, hors *Pseudomonas*, représentent environ 35 % de l'ensemble des infections nosocomiales, chiffre supérieur à celui retrouvé avec les staphylocoques ou les pyocyaniques.

Ces germes présentent des profils de résistance aux principaux antibiotiques différents, expliquant la difficulté de traiter les pathologies infectieuses dont ils sont responsables. Cette diversité des résistances naturelles impose de réaliser un antibiogramme dès qu'il y a infection par l'un quelconque de ces germes.

- Le genre *Acinetobacter* inclut des bacilles à gram négatif, aérobies stricts, dont la classification donne lieu à controverse. Il s'agit de germes saprophytes de l'eau et du sol, que l'on retrouve fréquemment sur l'homme sain où ils font partie de la flore résidente. Leur présence dans l'environnement hospitalier est banale et leur facilité à exprimer des résistances acquises en font des agents infectieux de premier plan. La localisation des sites infectés est étendue (analogue à celle décrite pour les *Serratia* ou les *Pseudomonas)* mais le pouvoir pathogène spontané des *Acinetobacter* reste faible. Les infections qu'ils peuvent induire concernent les sphères urinaires ou pleuro-pulmonaires, ainsi que les méninges ou le sang. Elles sont fréquentes chez des patients souffrant de brûlures étendues, en réanimation, ainsi que chez des sujets immunodéprimés ou soumis à une intense instrumentation (pose de cathéters, de perfusions, etc.).
  Les localisations respiratoires et les infections systémiques, isolées ou sur cathéters, sont maintenant plus fréquentes dans les unités de soins intensifs alors qu'elles étaient auparavant surtout urinaires et suppuratives. Les cathéters constituent une source fréquente d'isolement des *Acinetobacter*, et l'une des premières causes de bactériémie ou de septicémie.
- Les entérobactéries sont des bacilles à gram négatif asporulés. Ces bactéries colonisent d'une façon saprophyte ou pathologique le tube digestif. Leur présence dans le milieu extérieur signe une contamination fécale ou une pollution saprophytique, ce qui explique qu'elles se retrouvent dans les eaux des égouts, les fumiers ou les cadavres. Il est également possible, quoique plus rarement, de les isoler de la surface des téguments et des muqueuses. Certaines d'entre elles constituent des espèces pathogènes spécifiques ; elles peuvent engendrer de ce fait des maladies dues à un défaut d'hygiène, la contamination étant réalisée soit par un contact direct, soit par l'intermédiaire d'un vecteur alimentaire ou animal. Appartiennent à ce groupe les *Salmonella*, les *Shigella* ou encore les *Yersinia*. D'autres entérobactéries (*Escherichia coli, Clostridium perfringens*, *Serratia*, *Proteus* ou *Providencia)* sont plus rarement pathogènes, notamment lorsqu'elles participent au développement d'une infection opportuniste. Elles proviennent en ce cas de la flore digestive résidente ou d'un défaut d'hygiène ou d'asepsie (danger important en milieu hospitalier).
  Klebsiella, *Enterobacter*, *Hafnia* et *Serratia* sont souvent réunis dans la tribu des Klebsielleae, composant le groupe KEHS responsable de plus de 10 % des infections nosocomiales. Ces entérobactéries furent pendant longtemps considérées comme essentiellement commensales. La pression constante et accrue des antibiotiques a entraîné une sélection de souches multirésistantes, notamment chez *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae* et *Serratia marcescens*. Ces espèces sont devenues des pathogènes opportunistes fréquemment isolés d'infections urinaires ou pulmonaires, du pus, de septicémies, particulièrement en milieu hospitalier. La résistance aux antibiotiques augmente des *Klebsiella* aux *Enterobacter* pour culminer dans le genre *Serratia* où les souches multirésistantes abondent.
  Les *Klebsiella*, naturellement résistantes à l'ampicilline ou à la carbénicilline, demeurent souvent sensibles aux céphalosporines, au cotrimoxazole, à divers aminosides, à la colistine, à l'acide nalidixique et, dans le cas de localisations urinaires, aux dérivés furaniques.

Le genre *Enterobater* comprend de nombreuses espèces à l'origine d'infections nosocomiales :

- *Enterobacter aerogenes,* proche de *Klebsiella pneumoniae* au plan biochimique et au plan antigénique, est isolée des fécès, du rhino-pharynx, des expectorations, du pus, d'hémocultures ou du LCR. Naturellement résistante à l'ampicilline comme aux céphalosporines, elle se différencie des *Klebsiella* par sa sensibilité à la carbénicilline ;
- *Enterobacter cloacae,* isolée des eaux usées – elle est extrêmement mobile –, du sol, des végétaux, prolifère sur la peau et peut coloniser comme commensal le tube digestif. De fait, elle donne lieu à de possibles pathologies opportunistes, notamment en milieu hospitalier. Elle est alors isolée de l'urine, du pus, d'expectorations, du liquide pleural, moins fréquemment d'hémoculture ou du LCR, d'un cathéter ou d'une sonde. Cette espèce n'est jamais entéropathogène. Naturellement résistant aux bêta-lactamines anciennes et le plus souvent résistant aux cyclines ou aux sulfamides, il faut aussi souligner l'importante résistance de ce germe aux antiseptiques utilisés pour traiter l'eau ;
- *Enterobacter agglomerans* (= *Erwinia herbicola*) se caractérise par sa propension à former en culture des agglomérats entourés d'une gaine translucide. Il s'agit d'une bactérie tellurique, retrouvée dans des cultures faites à partir de végétaux, d'aliments, d'eau ou de prélèvements réalisés dans l'environnement hospitalier. Ce saprophyte peut rarement devenir un véritable germe opportuniste chez les nourrissons, les prématurés, les polytraumatisés, les immunodéprimés. Il est fréquent que le germe soit introduit dans l'organisme à la suite d'un geste invasif tel la pose d'un cathéter, d'une intubation, de la pose d'une ligne de perfusion ou d'un acte de petite chirurgie.

B. Levures, champignons et parasites

Les mycoses et parasitoses nosocomiales ne sont pas véritablement fréquentes (4,5 % des cas en 2006) :

- Il faut retenir l'éventualité d'une candidose (nourrissons, sujets immunodéprimés, suites de cathétérisme veineux ou de chirurgie cardiaque) ou d'une aspergillose (sujets immunodéprimés) ;
- S'agissant des parasitoses, seules les pneumocystoses survenant chez des patients immunodéprimés méritent d'être prises en compte au plan épidémiologique.

C. Virus et prions

La participation des virus aux infections nosocomiales reste quantitativement négligeable par rapport à celle des bactéries puisqu'ils sont à l'origine de quelques 0,2 % de l'ensemble des infections nosocomiales en France en 2006. La contamination est interhumaine. Les manifestations cliniques, souvent discrètes, concernent l'arbre respiratoire et le tractus intestinal (grippe, gastro-entérites à rotavirus, adénovirus, coronavirus ; la poliomyélite a un intérêt historique désormais). Exceptionnellement, il s'agit de manifestations éruptives (rougeole, varicelle, rubéole, herpès).

Les hépatites B et, à un degré moindre, A, constituent un risque pour les malades hospitalisés et le personnel, circonscrit par la prophylaxie vaccinale. Demeure le risque de contamination par le virus de l'hépatite C et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ainsi, et cela constitue un élément important à prendre en compte, que les infections par les prions à l'origine de maladies neurodégénératives.

III. Épidémiologie

La prévalence des infections nosocomiales en France était en 2006 légèrement inférieure à 5 %, pour une fourchette générale comprise entre 4,9 et 8,5 % dans les divers pays européens. Les infections nosocomiales urinaires dominent, suivies par les infections des voies respiratoires et les infections des sites opératoires. L'infection urinaire est l'infection la plus fréquente dans tous les services, sauf en réanimation (où les pneumopathies dominent) et en pédiatrie (où un faible taux d'infections nosocomiales s'associe à une large diversité des sites concernés).
Ces chiffres globaux varient largement selon le type d'établissement de santé (de 1,8 % pour les établissements psychiatriques à 9,3 % dans les Centres de Lutte Contre le Cancer CLCC) et de soins (de 0,9 % en obstétrique à 22,4 % dans les services de réanimation).
D'autres facteurs méritent d'être pris en compte, et les infections nosocomiales sont plus fréquentes chez les sujets âgés de 65 ans ou plus (ratio de 1,76), chez les hommes, chez les sujets immunodéprimés (ration de 2,47), chez les sujets opérés dans les 30 jours précédents l'enquête de prévalence, chez les sujets porteurs d'un cathéter vasculaire, d'une sonde urinaire, trachéotomisés ou intubés.
La surveillance épidémiologique des infections nosocomiales doit donc être adaptée en fonction de priorités identifiées localement, c'est-à-dire dans chaque service (infections sur escarres par exemple), car la répartition des sites infectieux varie selon la spécialité médicale.

IV. Prévention des infections nosocomiales

La reconnaissance de l'infection nosocomiale comme problème de santé publique date d'une dizaine d'années. Le premier décret créant et instituant les missions des comités locaux de lutte contre l'infection nosocomiale (CLIN) date de mai 1988. En 1992, cent recommandations furent diffusées à l'échelon national pour la mise en place d'une politique efficace de prévention des infections contractées à la suite de soins hospitaliers, impliquant notamment :

- Une modification des comportements, avec mise au point de protocoles écrits de prophylaxie des infections, de désinfection et de nettoyage ;
- Une prévention de la transmission par l'application de règles d'hygiène parfois simples mais négligées (lavage des mains), par des mesures d'isolement permettant d'interrompre la transmission croisée ;
- Une politique d'utilisation rationnelle des anti-infectieux visant à prévenir la sélection de mutants résistants.

À titre d'exemples, il est possible de préciser quelques mesures spécifiques mises en application pour prévenir certaines infections nosocomiales particulièrement banales :

- *Infections urinaires*. Les infections sur cathétérisme vésical constituent la plus fréquente des infections nosocomiales. La contamination peut être exogène (endoluminale, à la suite de l'ouverture du système de drainage par le patient ou le personnel soignant) ou endogène (extraluminale : les bactéries gagnent la vessie par voie ascendante à partir de la flore fécale loco-régionale). La prévention consiste à éviter l'utilisation de sondes urinaires et, en cas d'impossibilité, à réduire au maximum leur durée d'utilisation, à respecter l'asepsie lors de la pose ou des manipulations (insister sur le lavage des mains), à fixer solidement le cathéter, à maintenir un sondage urinaire clos, à utiliser les sondes à double courant si une irrigation vésicale est indispensable, à instaurer un drainage vésical déclive, à prélever de manière rigoureusement aseptique les ruines pour examen cytobactériologique et à vérifier que le débit urinaire est régulier pour prévenir une obstruction à l'écoulement (facteur de stase urinaire potentielle) ;
- *Pneumopathies*. Il importe de respecter les mesures d'éducation (suivis de protocoles écrits) ainsi que les mesures de surveillance.

En prévention du risque infectieux exogène, il faut :

- veiller au lavage des mains et au port de gants lors des aspirations ;
- isoler les patients (tuberculose pulmonaire, infection virale ou infection par germe multi-résistant) ;
- désinfecter le matériel, notamment les humidificateurs pour oxygénothérapie (intérêt des humidificateurs pré-remplis stériles) et des humidificateurs chauffants des respirateurs.

La prévention du risque infectieux endogène passe par :

- la prévention de l'inhalation de liquide gastrique (la position allongée accroît ce risque : préférer une position demi-assise) ;
- la prévention des inhalations de sécrétions oro-pharyngées par une désinfection soigneuse de l'oropharynx avant intubation ;
- la prévention de la colonisation et le maintien d'une vacuité suffisante des voies aériennes inférieures (aspirations bronchiques par la technique « no touch »).

V. Organisation de la lutte contre les infections nosocomiales

C'est en 1988 que le Ministère de la santé a instauré par décret la création des Comités de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN) dans les établissements publics de santé. Des structures inter-régionales et nationales de coordination et de conseil ont été créées ensuite, puis l'ensemble du dispositif a été étendu aux établissements de santé privés en 1998.

Cinq centres de coordination inter-régionaux (CCLIN : Est, Ouest, Paris et Nord, Sud-Est, Sud-Ouest) ont été mis en place par un arrêté de 1992. Ces centres de référence servent d'appui technique aux établissements hospitaliers et sont chargés d'appliquer la politique définie au niveau national et d'animer la coopération inter-hospitalière (réseaux de surveillance, formation, documentation, études diverses, etc.).

Les infections nosocomiales sont particulièrement fréquentes dans les services de réanimation, et dans les CHR et les Centres de Lutte Contre le Cancer. Elles sont avant tout urinaires, pulmonaires ou concernent le site opératoire.
Une politique de prophylaxie spécifique a été mise en place en France depuis 1988. Elle s'articule sur des structures nationales (CTIN), inter-régionales (CCLIN) et locales, dont l'échelon ultime est le Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN) propre à chaque établissement de santé, public comme privé.

Pour en savoir plus

- Revue « Hygiène en Milieu Hospitalier »
- Sites Internet :
  Ministère de la santé : www.sante.gouv.fr, dossier « Infections nosocomiales » actualisé en 2007.
  Base documentaires commune aux Centres de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales (CCLIN) : http://nosobase.chu-lyon.fr
  Institut national de Veille Sanitaire : www.invs.sante.fr, consultation des rapports sur les enquêtes de prévalence et consultation du Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire (BEH).
  Société Française d'Hygiène Hospitalière : www.sfhh.net
  Sites des divers CCLIN : www.cclin-sudouest.com, www.cclinparisnord.org, etc.

Vaccins : préparation et règles d'utilisation

J.-A. NICOLAS, C. BOSGIRAUD
Laboratoire de microbiologie, UER de pharmacie, Limoges.
D. RICHARD, Pharmacie, centre hospitalier Henri Laborit, Poitiers
(révision 2007)

La Pharmacopée européenne (PE, 6e édition, 2007) définit ainsi les vaccins : « Les vaccins pour usage humain sont des préparations contenant des substances antigéniques ayant la propriété de créer chez l'homme une immunité active spécifique contre l'agent infectant ou la toxine, ou l'antigène élaboré par celui-ci. Il doit être démontré qu'ils possèdent une activité immunogène acceptable chez l'homme lorsqu'ils sont administrés selon le programme de vaccination préconisé.
Les vaccins pour usage humain peuvent être constitués par : des organismes inactivés par des moyens chimiques ou physiques qui maintiennent des propriétés immunogènes adéquates ; des organismes vivants de faible virulence naturelle ou qui ont été traités afin d'atténuer leur virulence tout en maintenant des propriétés immunogènes adéquates ; des antigènes extraits des organismes ou sécrétés par ceux-ci, ou préparés par génie génétique ; les antigènes peuvent être utilisés dans leur état d'origine ou ils peuvent être détoxifiés par des moyens chimiques ou physiques et peuvent être sous forme d'agrégats, de conjugats ou de polymères afin d'augmenter leur pouvoir immunogène ; les antigènes ou les fractions antigéniques sont rendus inoffensifs, si nécessaire. »
Toutes les vaccinations obéissent à des lois communes, soigneusement établies, qu'il convient de respecter scrupuleusement. Il existe des indications et des contre-indications précises pour chaque type de vaccination. Lorsque les indications sont prévues par un texte légal, la vaccination devient obligatoire ; dans le cas contraire, la vaccination est facultative mais peut être recommandée par l'OMS. Les contre-indications vaccinales sont toujours soulignées par les fabricants de vaccins, mais également par des arrêtés ministériels. Leur inobservation constitue une faute légale.
La vaccination peut être effectuée à partir de virus inactivés *ou de corps bactériens tués. Ces vaccins déterminent la formation d'anticorps survenant dans les 4 jours après la vaccination. Le rythme des injections est réglé par la connaissance de la meilleure sollicitation antigénique qui doit être à la fois efficace et inoffensive.*
La vaccination peut être effectuée à partir de virus ou de corps bactériens *vivants atténués. Ces vaccins vivants entraînent une infection de l'organisme qui reproduit les conséquences immunitaires de la maladie naturelle. Une seule administration vaccinale est de ce fait en général nécessaire (vaccination antipoliomyélitique orale). Dans tous les cas, la qualité de l'immunisation obtenue se rapproche de celle déterminée par l'infection naturelle, et fait de celle-ci la meilleure des vaccinations.*
La vaccination peut être effectuée à partir d'une anatoxine *lorsque la toxicité du germe est l'élément essentiel de la maladie infectieuse. Il en est ainsi dans le cas du tétanos, de la diphtérie. On n'immunise pas contre le germe mais contre sa toxine.*
Les vaccins sous-unités bactériennes sont constitués *de sous-unités d'oligosaccharides ; ils sont conjugués (Haemophilus influenzae) ou non conjugués (vaccin antiméningococcique ou pneumococcique).*
Le vaccin contre l'hépatite B est obtenu par recombinaison génétique.
Les vaccins adsorbés : leur principe est de renforcer leur pouvoir antigénique par l'emploi de substances adjuvantes appropriées (sels d'aluminium, par exemple). C'est ainsi que les vaccins adsorbés contre la diphtérie, le tétanos, la coqueluche, la poliomyélite, sont plus efficaces que les vaccins classiques.
Les vaccinations peuvent être associées chaque fois que la nature des vaccins le permet. Ce sont des associations d'anatoxines entre elles, ou avec des vaccins tués ou avec des vaccins sous-unités ; l'association de vaccins inactivés entre eux existe aussi.
Il est important de prévoir plusieurs étapes et par conséquent un certain ordre chronologique lorsque l'on veut immuniser un individu contre diverses maladies. Cette immunisation étant souhaitable dès l'enfance, le calendrier des vaccinations doit également

La production de vaccins en lignée cellulaires continues ou diploïdes nécessite un *système de banque de cellules*. Chaque banque de cellules de travail est issue de la banque de cellules primaires. Ces différentes banques de cellules doivent être répertoriées, contrôlées, cultivées selon des protocoles standardisés (identification des cellules de semence, stabilité, recherche de contaminants infectieux et d'agents étrangers, tumorigénicité, caractérisation chromosomique).
Les vaccins viraux sont produits à partir d'un *système de lot de semence viral*. Pour cela, on constitue un lot de semence primaire correspondant à une suspension virale contrôlée, répertoriée, stable et conservée à – 70 °C. Elle servira à préparer le lot de semence de travail utilisée dans la production.
« Les vaccins obtenus par la méthode dite de l'ADN recombinant sont le résultat d'une modification génétique qui consiste à introduire, le plus souvent en utilisant comme vecteur un plasmide ou un virus, de l'ADN codant pour la substance souhaitée dans un micro-organisme ou une lignée cellulaire convenable, où cet ADN est exprimé et traduit en protéine (*PE*). »

B. La fabrication

La fabrication des vaccins pour usage humain est soumise à de nombreuses exigences concernant les différentes étapes de la production et les essais effectués en cours de fabrication. Ces exigences sont publiées sous forme de monographies dans la *Pharmacopée européenne*.
Au cours des différentes étapes de la fabrication, toutes les opérations doivent être décrites et justifiées : les préparations des lots de semence utilisés, le nombre de passages d'un virus, les additifs utilisés (stabilisants, adjuvants), les substrats pour les milieux de culture, les milieux de culture, les différentes étapes de multiplication, de récoltes, de purification et d'inactivation, les étapes intermédiaires, le vrac final (adsorbants et conservateurs) et le lot final. Chaque lot de fabrication est soumis aux différents essais décrits dans les monographies correspondantes. Toutes ces descriptions figurent dans le dossier d'AMM (autorisation de mise sur le marché).

C. Contrôle des vaccins

1. Principe – Organisation des contrôles

Pour chaque lot, doivent être effectués :
- un contrôle d'efficacité ;
- un contrôle d'innocuité ;

qui doivent être réalisés :
  - par les autorités de contrôle d'État (LNS),
  - par le fabricant.

Toutes les étapes de la fabrication sont contrôlées, y compris les matières premières.
Pour être commercialisé, un vaccin doit avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) reposant sur trois rapports établis par des experts agréés par le ministère de la Santé :
- rapport analytique ;

5. Conservation et étiquetage

Les contraintes de conservation et d'étiquetage figurent également dans la monographie « Vaccins pour usage humain » avec des particularités figurant dans les monographies spécifiques à chaque vaccin.

L'étiquette indique :
- le nom de la préparation ;
- une référence qui identifie le lot final ;
- la dose humaine recommandée et la voie d'administration ;
- les conditions de conservation ;
- la date de péremption ;
- le nom du conservateur antimicrobien, le cas échéant ;
- le nom des antibiotiques, adjuvants, aromatisants et stabilisants présents, le cas échéant, dans le vaccin ;
- la mention des substances susceptibles de provoquer des réactions secondaires, des contre-indications pour l'utilisation du vaccin ;
- dans le cas des vaccins cryodesséchés : le nom ou la composition et la quantité du liquide de reconstitution à ajouter, et la période pendant laquelle le vaccin doit être utilisé après reconstitution.

6. Aspects réglementaires et éthiques

Les vaccins devant protéger des sujets sains doivent être bien tolérés. On accepte quelques inconvénients dans la protection d'une maladie grave et fréquente ; on ne les accepte pas si la maladie est rare ou relativement bénigne.

a) La législation

La société peut légitimer la contrainte vaccinale en alléguant qu'on ne peut tolérer le double risque épidémiologique et économique auquel l'exposent les individus non vaccinés.
Actuellement, la vaccination antipoliomyélitique est obligatoire, comme les vaccinations antitétaniques, diphtériques et le BCG. La société doit assumer les risques pouvant résulter de ces vaccinations (loi du 11 juillet 1964).

b) Calendrier des vaccinations

Il doit tenir compte des incompatibilités entre certains vaccins. Il doit s'adapter à la situation épidémiologique dans le pays considéré. Il est publié au *BEH*.

II. Les vaccins antipoliomyélitiques

La vaccination antipoliomyélitique est obligatoire en France depuis le 1er juillet 1964. Il n'y a pas d'immunité croisée entre les trois types de virus polio. Deux types de vaccins peuvent être et sont utilisés :
- les vaccins tués ou inactivés : injectables ;
- les vaccins buvables vivants de virulence atténuée.

- les autres essais en cours de fabrication ou sur le lot final concernent la recherche des agents étrangers, l'identification des lots de semence, des cellules et des virus vaccinaux, des essais de stérilité, les conditions de conservation et d'étiquetage.

Ce vaccin étant à usage oral, un *essai de stabilité thermique* est effectué sur chaque lot final.

Certaines contraintes d'étiquetage sont spécifiées : les types de virus contenus dans le vaccin, la quantité minimale de chaque virus dans une dose unitaire, la nature du substrat cellulaire et le fait que le vaccin ne doit pas être injecté.

2. Avantages du VPO

Comme tous les vaccins vivants, le VPO est constitué de virus ayant perdu leur pouvoir pathogène par atténuation, par mutation et se répliquant dans l'organisme, provoquant chez le vacciné une véritable infection en principe asymptomatique.

Le VPO confère une *immunité* à la fois humorale, cellulaire et tissulaire comme dans l'infection naturelle, rapide à s'instaurer et de longue durée. Dans le cas du VPO, les virus vaccinaux se multiplient dans les cellules de la muqueuse de l'intestin. Des IgA locales sont produites. Une protection très rapide du vacciné s'instaure d'abord par l'interféron et les IgA locales, puis les IgM et les IgG apparaissent. Les virus vaccinaux sont excrétés par les selles pendant plusieurs semaines ou même plusieurs mois, le maximum se situant du 7e au 20e jour. L'élimination se fait aussi par le rhinopharynx. La production d'anticorps neutralisants empêche le virus de se multiplier dans les cellules du système nerveux.

Comme tous les vaccins vivants, il nécessite une *faible charge antigénique*, le coût à la fabrication est modéré comparativement aux vaccins inactivés. Ainsi le prix de revient est plus intéressant.

L'utilisation par la voie orale du VPO est un avantage dans les pays en développement où il n'est employé *qu'en cas d'épidémie* pour supplanter le virus sauvage circulant.

De plus, en période épidémique, l'utilisation d'un vaccin monovalent correspondant à un type de virus identifié circulant est possible et efficace.

3. Inconvénients du VPO

- Les inconvénients majeurs du VPO sont le risque de *réversion* d'une souche vaccinale vers la neurovirulence du génotype sauvage et les problèmes d'interférence, entre les souches vaccinales, ou avec des souches sauvages circulantes ou encore avec d'autres entérovirus, sous forme de recombinaisons génétiques entre virus (par exemple, des virus Coxsakies ou Echo présents dans les cellules de l'intestin et des virus empêchant l'installation de souches vaccinales).
- Les virus poliomyélitiques, virus à ARN, sont le siège de *nombreuses variations génomiques* sous forme de mutations ponctuelles fréquentes dues à des erreurs de recopiage de l'ARN polymérase ARN dépendante virale, en absence de système de correction. Les recombinaisons génétiques entre virus vaccinaux peuvent donner lieu à des recombinants intertypiques ; les recombinaisons génétiques ont surtout lieu dans les régions codant pour les protéines non structurales.
- Comme les autres virus vaccins potentiellement *neurovirulents*, le VPO doit être particulièrement contrôlé, notamment par le test de neurovirulence.

l'adjonction à l'Ag S du déterminant pré-S2 pouvait accroître considérablement le potentiel immunogène d'un vaccin traditionnel.
La pleine immunogénicité de l'antigène HBs nécessitant l'assemblage de la protéine majeure sous forme de dimères, cet antigène est dit conformationnel.
Grâce à des techniques de clonage et de séquençage du génome viral, on connaît les régions nécessaires à l'expression des protéines d'enveloppe. Mais ces protéines ne sont pas assemblées par les bactéries, des systèmes plus sophistiqués tels que les cellules eucaryotes ont été utilisés. Les vaccins développés actuellement sont produits soit à partir de cellules de levures, soit à partir de cellules de mammifères. Ainsi, on a pu obtenir à partir de ces deux types de cellules eucaryotes des protéines d'enveloppe assemblées en particules.
Après transfection dans des cellules de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) du gène codant pour la protéine majeure d'enveloppe, les protéines ne sont pas sécrétées ni glycosylées, mais peuvent être assemblées sous forme de particules par des traitements mécaniques (casse des cellules). En revanche, les cellules animales en culture sont capables de glycosyler les protéines, de les assembler en particules de 22 nm et de les sécréter dans les milieux de culture.
Une analyse fine de ces particules a permis de montrer que leur composition lipidique et glycosidique était très proche de celle des particules purifiées à partir des sérums humains.
Ainsi les vaccins recombinants actuels sont de deux types :
- les vaccins produits par la levure Saccharomyces cerevisiae, HB vax Pro® et Engerix B®, qui contiennent l'antigène HBs ;
- le vaccin de 3e génération Genhevac B®, produit à partir de cellules de mammifères (cellules d'ovaire de hamster chinois ou CHO) qui contient les protéines HBs et pré-S2.

C. Fabrication des vaccins

Selon la monographie correspondante, « le vaccin de l'hépatite B (ADNr) est une préparation de l'antigène de surface de l'hépatite B (Ag HBs), une protéine constitutive du virus de l'hépatite B, qui peut être adsorbé sur un support minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate hydraté d'aluminium. L'antigène est obtenu par la méthode de l'ADN recombinant ».
L'obtention d'un vaccin recombinant comporte plusieurs étapes : les *gènes d'intérêt* sont tout d'abord *clonés* puis intégrés dans un *vecteur d'expression*, en général un plasmide. Ce plasmide est ensuite introduit dans une *cellule hôte* (*Saccharomyces cerevisiae* ou CHO). L'association stable cellule hôte et vecteur est appelée *système hôte-vecteur*. La cellule hôte transformée renferme une nouvelle information génétique qui conduit à l'expression d'une *protéine recombinante* ayant conservé ses propriétés d'antigénicité et d'immunogénicité. Une expression correcte dépend des processus génétiques de transcription et de traduction et de la façon dont la protéine recombinante, une fois synthétisée, est modifiée par la cellule hôte dont le choix est fondamental.
À l'état natif, l'antigénicité et l'immunogénicité de la protéine recombinante dépendent de sa stabilité, de la glycosylation de certains résidus amino-acides ou de sa

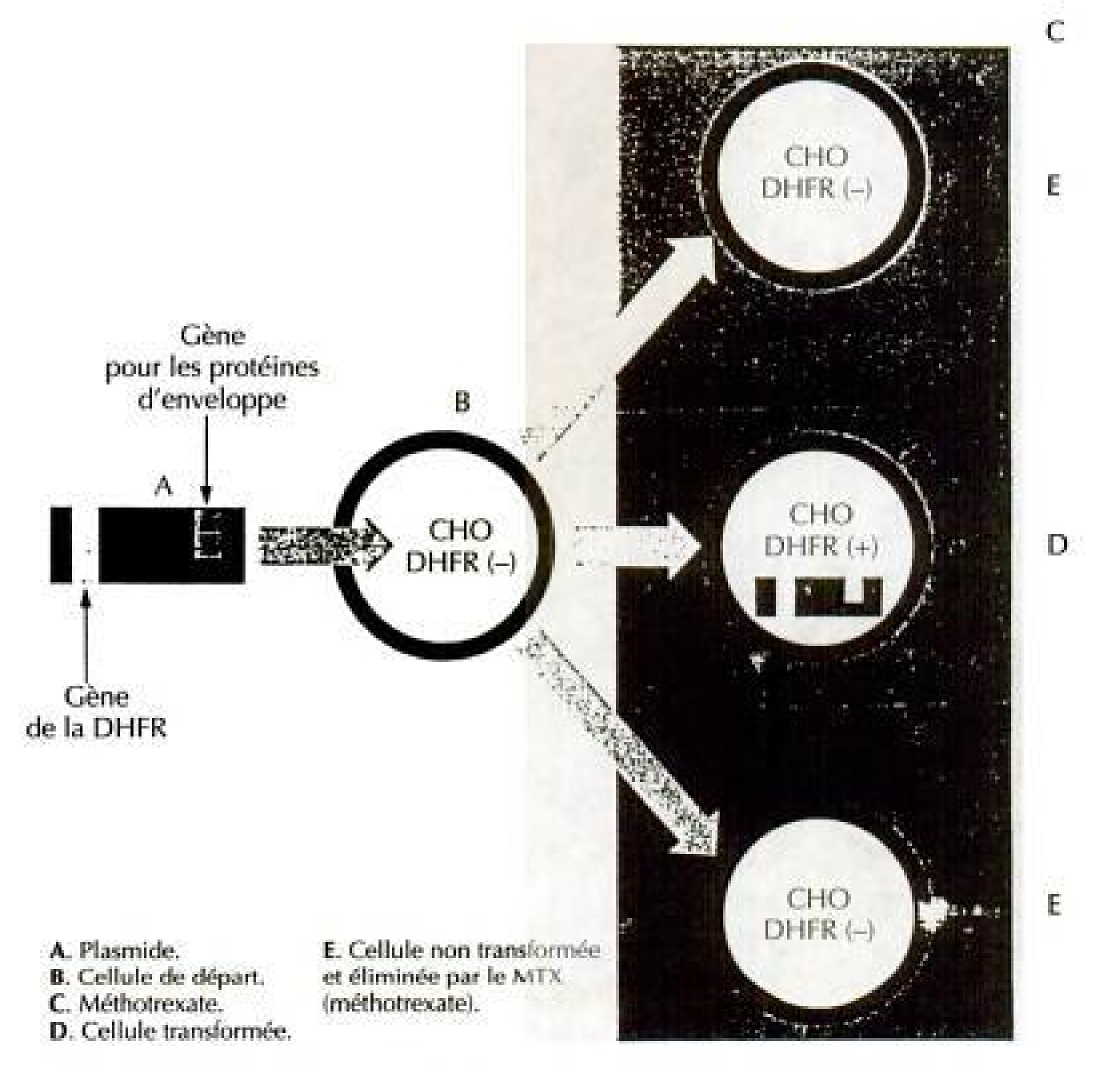


Figure 2. Recombinaison génétique : sélection des cellules transformées

b) Les étapes de fabrication

Elles ont été choisies pour leur efficacité dans l'élimination des impuretés apportées par le substrat cellulaire utilisé (protéines, ADN cellulaire, rétrovirus) :

- *Ultrafiltration-concentration :*
  Élimination des particules rétrovirales et débris cellulaires (ADN).
- *Fractionnement au PEG :*
  Élimination des protéines du sérum de veau, des particules virales et des débris cellulaires.
- *Centrifugation zonale de vélocité :*
  Discrimination selon la taille des particules, donc élimination des protéines sériques, de l'ADN et des virus de coefficients de sédimentation élevés.
- *Centrifugation isopycnique :*
  Discrimination selon la densité, donc élimination de l'ADN et des protéines sériques, de densité plus élevée.
- *Chromatographie par échange d'ions :*
  Rétention de l'ADN résiduel et de l'albumine bovine.
- *Inactivation :*
  Le double traitement par la chaleur et le formol est efficace pour l'inactivation des différentes classes de virus.

- *Caractéristiques des particules d'Ag HBs synthétisées dans les cellules CHO :*
  Le matériel purifié est constitué des particules d'Ag HBs de 22 nm (microscope électronique, spectre de densité optique, coefficient de sédimentation). La structure des particules Ag HBs de 22 nm obtenues dans les cellules CHO est identique à celle des particules d'origine humaine. Elles contiennent l'antigénicité virale de groupe (spécificité a) et de sous-type (ay) ainsi que l'activité récepteur pour la pHSA. L'analyse par électrophorèse confirme la richesse du vaccin en déterminants antigéniques pré-S2.

c) Techniques de contrôles

Ce sont celles décrites dans le paragraphe « Fabrication de vaccins ».

d) La vaccination

La vaccination se fait par voie intramusculaire. La dose par injection est de 20 µg quel que soit l'âge du sujet. Les schémas de vaccination sont ceux développés dans le chapitre « Calendrier des vaccinations ».
Il n'y a pas de contre-indications en cas de grossesse ni d'allaitement.
Genhevac B® ne doit pas être mélangé à d'autres vaccins dans la même seringue.

2. Fabrication du vaccin Engerix B®

Le vaccin Engerix B® a reçu l'acceptation de sa mise sur le marché en 1986. Le choix de la cellule-hôte s'est porté sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*.
Outre son innocuité, la levure présente d'autres avantages qui justifient son emploi pour la production d'Ag HBs : sa structure génétique et sa physiologie sont bien connues ; sa fermentation peut se faire dans des milieux nutritifs synthétiques simples et elle offre une densité cellulaire très élevée. En plus, elle ne produit aucune endotoxine nuisible.
Le gène S destiné à être introduit dans *S. cerevisiae* a été préparé à partir du sérum d'un sujet porteur chronique du VHB (*fig. 4*). Après avoir isolé le VHB de ce sérum, on extrait l'ADN viral. Ensuite, le gène S est isolé grâce à des enzymes de restriction, qui rompent la chaîne d'ADN à des endroits précis. Au cours d'un processus complexe comprenant plusieurs étapes, le gène S est fusionné à un promoteur TDH3.
Ce dernier, choisi parce qu'il provient d'un gène de *S. cerevisiae*, code une enzyme produite en grande quantité dans les cellules de levure, la glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase. Cette première combinaison génétique réalisée, l'unité ainsi formée est combinée à d'autres fragments d'ADN de la levure, comme le vecteur de clonage pBR327 et la copie complète d'un plasmide de levure.
Le résultat final (plasmide d'expression ou recombinant) est introduit par transformation protoplasmique dans *S. cerevisiae* où il déclenche la production de particules d'Ag HBs. La cellule hôte et le plasmide ont été parfaitement définis pour assurer la stabilité et la fidélité de l'expression de l'Ag HBs dans des conditions industrielles de fermentation.

a) Multiplication et prélèvement des cellules de levure recombinées

La fabrication de vaccin se base sur un système de culture en lots. Dans ce système, une population homogène de levures recombinées est répartie dans un nombre donné de récipients. Ces derniers sont stockés dans un environnement stable dans

b) Purification et formulation du vaccin

Les cellules de levure ainsi récoltées sont broyées pour libérer leur contenu qui sera soumis à une succession d'étapes de purification. La combinaison des techniques de précipitation, d'ultrafiltration, de filtration sur gel et de chromatographie par échanges d'ions a permis de mettre au point un processus industriel de purification produisant un antigène protéique pur à plus de 97 %. La teneur en lipides des particules purifiées est maintenue dans des limites étroites et on ne décèle, par la technique de l'hybridation de l'ADN, aucune contamination par l'ADN de l'hôte, et ce pour une sensibilité de 10 pg d'ADN de levures par dose.
Pour la production du vaccin, l'antigène purifié est d'abord stérilisé par filtration membranaire. On l'ajoute ensuite lentement à une suspension stérile d'hydroxyde d'aluminium tamponnée. Après quoi le vaccin est réparti en seringues, contrôlé, conditionné et stocké à une température comprise entre + 2 et + 8 °C. Comme tous les vaccins adsorbés, il ne doit pas être congelé.

c) Produit final

Le vaccin est essentiellement constitué d'un polypeptide non glycosylé de 226 acides aminés, codé par le gène S d'un virus VHB, assemblé sous la forme de particules sphériques de 20 nm contenant 10 g de lipides dérivés de la levure.
Le vaccin final contient un polypeptide pur à plus de 97 %, comme le montre l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.
Les autres composants résiduels dérivés de la levure comprennent moins de 2 µg de polysaccharides et moins de 5 pg d'ADN de levure et de plasmide par dose.
Chaque dose de vaccin comprend 20 µg de polypeptide adsorbé sur l'hydroxyde d'aluminium et est contenue dans une suspension d'1 mL contenant 1/20 000e de thimérosal comme conservateur.

d) Contrôles de qualité

La standardisation de toutes les étapes de fabrication de l'Engerix B® est vitale pour garantir l'uniformité de tous les lots de vaccins produits.
En plus de la conduite automatique des opérations de production, des tests de contrôle de qualité sont prévus à quatre stades bien définis de la fabrication.
Ces contrôles de qualité sont conformes aux exigences de la *PE* et de l'Organisation mondiale de la santé concernant les vaccins contre l'hépatite B.
La première phase du contrôle de qualité consiste à tester la bonne croissance des cultures au cours de la fermentation. Pour ce faire, on réalise une détermination du poids sec des cellules, un contrôle de pureté microbiologique et des tests de rétention du plasmide. Après l'éclatement des cellules, on détermine la concentration par litre en Ag HBs, par méthode radio-immunologique.
De nombreux contrôles de qualité sont encore effectués sur l'Ag HBs en vrac, non adsorbé, pour vérifier sa pureté, son innocuité : mesure du contenu en protéines, en polysaccharides et en lipides, dosage de l'ADN résiduel et tests de stérilité et de recherche d'endotoxines. La dernière étape du contrôle de qualité consiste à vérifier la qualité du lot du vaccin : description, identité, pH, volume, teneur en aluminium et stérilité doivent être en accord avec les normes préétablies. Pour terminer cette phase de contrôle, on recherche les facteurs pyrogènes, on vérifie l'absence de toxicité

3. Le vaccin HB VAX DNA

Il existe sous trois présentations :

- HB VAX Pro® 5 µg/0,5 mL.
  À ce dosage il est réservé aux nouveau-nés (dont les nouveau-nés d'une mère Ag HBs positif) et enfants jusqu'à 15 ans ;
- HB VAX Pro® 10 µg/mL : pour l'adulte ;
- HB VAX Pro® 40 µg/mL : il est réservé aux sujets dialysés ou en attente de dialyse.

IV. La vaccination antitétanique

C'est en 1888, à l'Institut Pasteur de Paris, que fut découvert, par les docteurs Roux et Yersin, le premier poison bactérien dans des filtrats de culture de bacille diphtérique. En 1890, Faber mettait en évidence la toxine tétanique qui, comme la toxine diphtérique, est de nature protéique et antigénique.
1923 : anatoxine diphtérique de Ramon et Glenny.
1927 : anatoxine tétanique de Ramon et Zoeller.
C'est Lowenstein qui, en 1908, montra que les toxines incubées à 37 °C avec du formaldéhyde se transformaient en dérivés non toxiques.
En 1923, Glenny et Sudmersen en Grande-Bretagne, Ramon en France, mirent à profit cette découverte pour apporter la preuve que ces dérivés atoxiques gardaient, en fait, le pouvoir immunogène et l'antigénicité de la toxine native.
La voie de la vaccination antitétanique et antidiphtérique était ouverte à une échelle mondiale dès 1926 : elle devait aboutir, sur le plan sanitaire, grâce à l'immunisation systématique des collectivités, à une diminution considérable des cas de diphtérie et de tétanos dans les pays développés.
Au sein de la toxicité globale conférée par la bactérie, on doit discerner la toxine contribuant au pouvoir pathogène, ce qui nous amène à aborder les notions d'antidote, ou plus exactement de prophylaxie avec l'anatoxine et de traitement curatif avec l'emploi de l'antitoxine.
Ces trois concepts sont proches sur le plan structural mais fondamentalement différents quant à leur incidence pathogène ou thérapeutique.

A. Définitions

1. Toxine

Une toxine est une substance macromoléculaire protéique ou glucidolipidopolypeptidique d'origine bactérienne létale et toxique *in vivo* et *in vitro*, pour un organisme animal ou végétal.
Les exotoxines protéiques sont des médiateurs chimiques sécrétés par la bactérie, caractérisés par un fort potentiel toxique ainsi que par un pouvoir immunogène.
Les endotoxines, constituants de la cellule bactérienne, ne sont libérées qu'à la lyse de la bactérie et possèdent une pathogénicité moindre.

2. Anatoxine ou toxoïde

La *Pharmacopée européenne* définit les anatoxines bactériennes comme étant des substances « préparées à partir de toxines par réduction de leur toxicité à un niveau non décelable, ou par neutralisation complète de cette toxicité au moyen de méthodes physiques ou chimiques, tout en maintenant des propriétés immunogènes adéquates. Les toxines sont obtenues à partir de souches sélectionnées de micro-organismes. La méthode de préparation est choisie de façon à transformer de manière irréversible la toxine en anatoxine. Les anatoxines peuvent être liquides ou cryodesséchées. Elles peuvent être purifiées et absorbées ».
L'addition à une toxine du formol et son maintien à la chaleur pendant plusieurs semaines contribuent à détruire le groupement toxophore de la toxine avec perte de son pouvoir toxinogène. Le groupement haptophore est conservé et confère à l'anatoxine ses propriétés immunisantes.
Les anatoxines tétanique et diphtérique seront utilisées en prophylaxie pour la vaccination des populations afin de leur conférer une immunité durable, pérennisée par des rappels réguliers (elles ne vaccinent que contre l'exotoxine et non contre la multiplication de la bactérie).

3. Antitoxine

L'antitoxine correspond aux anticorps fabriqués par l'organisme pour combattre les effets d'une toxine. Elle devient de plus en plus abondante au fur et à mesure que l'immunité devient plus forte. L'antitoxine présente dans le sang de sujet hyperimmunisé, ou après immunisation de l'animal, fait partie du traitement d'urgence de l'infection bactérienne et contribue à la protection immédiate mais brève de l'individu.
L'immunsérum tétanique fait l'objet de quatre monographies dans la *Pharmacopée européenne*.

B. Quelques rappels sur le tétanos

Le tétanos, maladie à déclaration obligatoire, est une *toxi-infection* due à un bacille anaérobie Gram positif, capable de sporuler, *Clostridium tetani*. Cette bactérie est ubiquitaire, commensale du tube digestif des animaux et persiste dans le sol sous forme sporulée extrêmement résistante.
Elle pénètre dans l'organisme par *effraction cutanéo-muqueuse* (plaie, piqûre, ulcère). Lorsque les conditions d'anaérobies sont réunies, il y a alors germination des spores et production de toxines qui, en interférant avec les neurotransmetteurs, vont entraîner, après une incubation comprise entre 24 heures et 3 semaines, une atteinte neuromusculaire avec contractures (trismus), spasmes musculaires et convulsions.
La maladie peut se présenter sous trois formes : généralisée (la plus grave, 80 % des cas), localisée à la région proche de la plaie, ou céphalique avec atteinte des nerfs crâniens.
La bactérie produit 2 exotoxines : la tétanolysine (hémolysine) et la *tétanospasmine* antigénique, responsable de la maladie.

La tétanospasmine est constituée de 2 chaînes reliées par un pont disulfure. La chaîne A, légère, serait responsable de la toxicité. L'autre chaîne, lourde, se fixe aux récepteurs cellulaires. À partir de la porte d'entrée, la toxine tétanique gagne les neurones par voies hématologiques, nerveuse et lymphatique. La liaison de la toxine avec la membrane présynaptique des terminaisons nerveuses se fait par fixation à des récepteurs gangliosidiques ou protéiques. Après fixation, la toxine s'internalise dans la terminaison des motoneurones α de la corne antérieure de la moelle, des neurones sensitifs et des neurones du système nerveux autonome. Elle devient alors inaccessible aux antitoxines.
La maladie n'est pas immunisante.
Selon les estimations de l'OMS, il y aurait par an environ un million de cas de tétanos dans le monde avec 500 000 décès. Dans les pays en développement, le tétanos néonatal tue 4,5 enfants pour 1 000 naissances. Du fait de la vaccination rendue obligatoire en France en 1940 pour les enfants en âge scolaire, le nombre annuel est d'environ 100 cas actuellement : ce sont surtout les sujets âgés et plus particulièrement les femmes qui n'ont pas été revaccinées au cours du service militaire.
Même si le nombre de cas annuel de tétanos reste faible, c'est une maladie grave entraînant une hospitalisation longue en service de réanimation, des traitements étiopathogéniques lourds (myorelaxant, barbiturique, analgésique, curare, agents α et bêtabloquants). Les risques de séquelles restent importants.

C. Préparation et contrôles de l'anatoxine tétanique

Selon la *Pharmacopée européenne*, « le vaccin tétanique adsorbé est une préparation d'anatoxine tétanique adsorbée sur un support minéral. L'anatoxine est obtenue par l'action du formaldéhyde sur la toxine résultant de la croissance de *Clostridium tetani* ».
L'anatoxine tétanique est préparée à partir d'une production de toxine tétanique purifiée. Pour cela, on utilise des *cultures de semences* d'une souche de *Clostridium tetani* fortement toxigène dont l'origine et l'historique sont connus. Les cultures sont recueillies en fin de croissance à partir d'un milieu de culture approprié, exempt de substances reconnues comme ayant provoqué des réactions toxiques, allergiques ou d'autres réactions indésirables. Le milieu contenant la toxine est récolté aseptiquement et la *teneur en toxine* exprimée en Lf (unité floculante c'est-à-dire la quantité de toxine ou d'anatoxine qui peut saturer une unité antitoxique d'un étalon international) est contrôlée.
La toxine est purifiée puis détoxifiée par le formaldéhyde et la chaleur à 39 °C pendant 28 ou 31 jours selon une méthode qui évite de détruire l'activité immunogène de l'anatoxine et la réversibilité de la toxine.
L'anatoxine purifiée en vrac ainsi obtenue doit satisfaire aux essais de stérilité, d'absence de toxine tétanique, d'irréversibilité de l'anatoxine et de pureté antigénique (minimum de 1 000 Lf/mg d'azote protéique) décrits dans la *PE*.
Puis le vrac est préparé par *adsorption de l'anatoxine* sur du phosphate d'aluminium hydraté, de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate de calcium dans une solution de chlorure de sodium à 0,9 %. Des conservateurs antimicrobiens peuvent être ajoutés, excepté les conservateurs de type phénolique qui altèrent l'activité antigénique de l'anatoxine.

Le *lot final* doit satisfaire aux essais d'identification, de toxicité spécifique, à la recherche d'aluminium ou de calcium, de formaldéhyde libre, de conservateurs antimicrobien et de stérilité, décrits dans la *PE*.

L'activité du vaccin tétanique adsorbé est titrée par la détermination de la dose nécessaire pour protéger des cobayes ou des souris contre les effets paralysants d'une dose de toxine tétanique administrée par voie sous-cutanée. Dans cet l'essai concerné, la dose testée est comparée à celle d'une préparation de référence étalonnée en unités internationales. La limite inférieure de confiance (P = 0,95) de l'activité mesurée ne doit pas être inférieure à 40 UI par dose humaine unitaire.

La *conservation et l'étiquetage* sont ceux décrits pour les vaccins humains. Le vaccin doit être conservé à 5 ± 3 °C à l'abri de la lumière et ne doit pas être congelé. Sur l'étiquette doivent figurer le nombre minimal d'UI/dose unitaire, le nom et la quantité d'adsorbant utilisé, il est recommandé d'agiter avant l'emploi et ne pas congeler.

D. La vaccination

La vaccination antitétanique est obligatoire en France pour les enfants avant 18 mois, les militaires et certaines professions à risques. Les injections se pratiquent en IM ou SC.

Stratégie préventive en cas de plaie : tableau 1.

Tableau 1. Prévention antitétanique en cas de plaie

Stratégie préventive en cas de plaie		
Situation vaccinale du patient	Nature de la plaie	
	Plaie minime	Plaie grave
Blessé correctement vacciné – preuve à l'appui Dernier rappel – moins de 5 ans – 5 à 10 ans – plus de 10 ans	 Rien Rien Vaccin (rappel)	 Injection de sérum si perte d'anticorps (hémorragie, brûlures…) sinon rien Vaccin (rappel) Vaccin (rappel) + sérum (250 UI)
Blessé non correctement vacciné (vaccination incomplète, douteuse ou absente)	Vaccin (vaccination complète ou simplifiée) + sérum 250 UI	 + sérum 500 UI

1. Indication de la vaccination

Outre les prescriptions légales, la prophylaxie du tétanos sera préconisée dans toutes les circonstances favorisant le développement de germes anaérobies, comme la prévention vaccinale avant certaines interventions chirurgicales, la prévention du tétanos obstétrical, ou ombilical, la prévention en présence de lésions cutanées d'évolution chronique, ou de plaie profonde à bords irréguliers, et la prévention devant une morsure par animal. Les anatoxines compatibles avec tout type de vaccins peuvent y être associées.

2. Contre-indications et effets indésirables

Le risque létal associé au tétanos dans la prophylaxie après exposition en cas de blessure exclut toute contre-indication potentielle.
Dans les autres cas, une hypersensibilité à l'un des composants du vaccin, une réaction d'hypersensibilité ou un trouble neurologique survenu lors d'une injection précédente due au vaccin, constituent des contre-indications.
Lorsque la vaccination antitétanique est associée à d'autres vaccins, il faudra tenir compte des recommandations de contre-indications publiées sur le *Vidal*.
Les effets indésirables liés à cette vaccination sont généralement bénins, limités le plus souvent à une réaction locale au point d'injection, à une réaction générale (hyperthermie, réaction d'hypersensibilité immédiate) entre 24 et 48 heures suivant l'injection.

3. Vaccins antitétaniques et associations

- Vaccin tétanique Pasteur ;
- Vaccin antitétanique + vaccin grippal : Tetagrip® ;
- Vaccin antitétanique + antidiphtérique + poliomyélitique : Vaccin DTP Pasteur, Revaxis®, DT polio ;
- Vaccin antitétanique + antidiphtérique + poliomyélitique + anticoquelucheux : Infanrixtetra®, Tétravac-Acellulaire®, Repevax® ;
- Vaccin antitétanique + antidiphtérique + poliomyélitique + anticoquelucheux + *Haemophilus influenzae b* : Infanrixquinta®, Pentacoq®, Pentavac®.
- Vaccin antitétanique + antidiphtérique + poliomyélitique + anticoquelucheux + *Haemophilus influenzae b* + hépatite B : Infanrixhexa® et Hexavac®.

Les associations de vaccins lors d'une même injection présentent les avantages, d'une part de simplifier l'acte vaccinal et d'autre part, d'intensifier la réaction immunitaire, les différents antigènes introduits jouant le rôle d'adjuvants réciproques, provoquant une synergie aboutissant à une immunité polyvalente.
L'efficacité immunologique du vaccin antitétanique peut être évaluée par le titrage des anticorps antitétaniques par une réaction d'hémagglutination passive (Vaccitest T Pasteur).

V. La vaccination contre les infections à papillomavirus humains

Le cancer du col de l'utérus occasionne plus de mille décès chaque année en France et 230 000 à l'échelle mondiale, le nombre de nouveaux cas déclarés étant d'environ 500 000 (dont 80 % dans les pays en voie de développement). Premier cancer à être reconnu par l'OMS comme attribuable dans 100 % des cas à une infection virale, il a pour origine des papillomavirus humains (HPV), agents infectieux abondants dans les organes génitaux et dont la transmission se fait par voie sexuelle. Bien qu'éradiqués spontanément par l'organisme, ils sont la cause de quelques 70 000 lésions précancéreuses chaque année. 65 % des femmes y sont exposées dès leur premier rapport sexuel.

En prophylaxie. Le vaccin contre le cancer du col de l'utérus (Gardasil® ; Cervavix®) a pour cible thérapeutique prophylactique, avant tout, la population des jeunes filles d'âge compris entre 10 ans et 15 ans.
Le vaccin anti-papillomavirus cible deux souches virales impliquées dans environ 70 % des cas de cancers du col : les HPV 16 et HPV 18. Il est composé de molécules de synthèse synthétisées par modélisation des composants de la paroi virale. Une fois la vaccination réalisée, la surface du col réagit par une production accrue de mucus, ce qui empêche le virus de pénétrer les cellules. La vaccination est réalisée à raison de trois injections sur six mois, avec une efficacité de 100 % pendant les quatre ans faisant suite aux administrations. Chacun des vaccins a, de plus, une efficacité sur d'autres types viraux de la famille des papillomavirus : HPV6 et HPV 11 pour le Gardasil®, deux virus impliqués dans le développement de verrues génitales, et divers HPV à l'origine de lésions pré-cancéreuses pour le Cervavix®. Toutefois, cette vaccination ne fait que réduire globalement les risques d'infection, car son efficacité varie avec le temps et ce de façon différente selon les sujets : il importe donc de poursuivre le suivi annuel par frottis. Le cumul de la prophylaxie et d'un dépistage de masse permettra cependant probablement d'envisager l'éradication de cette infection.
En curatif. L'efficacité d'un vaccin dirigé contre le papillomavirus humain 16 (HPV 16) a été récemment démontrée. Il inaugure le principe de la vaccination thérapeutique appliquée aux cancers, destinée à susciter une réponse immunitaire dirigée contre un constituant spécifique des cellules tumorales ciblées, avec alors production par l'organisme de cellules tueuses capables de lyser les cellules cancéreuses. Il s'agit en l'occurrence de fragments d'une protéine oncogène isolée de l'HPV 16, la protéine E7, couplés à une protéine bactérienne extraite de Bordetella pertussis et servant de vecteur. La protéine E7 du papillomavirus est exprimée par les cellules cancéreuses dans les lésions précancéreuses et les tumeurs du col utérin : elle est classée comme antigène tumoral. Le vaccin, administré à des souris porteuses de tumeurs modèles des tumeurs humaines, provoque une régression tumorale complète chez tous les animaux, en une injection unique. Ce type de vaccin en étude, différent du précédent, pourrait s'adresser aux femmes déjà infectées par le papillomavirus ou présentant des lésions précancéreuses.

VI. La vaccination contre les infections à rotavirus

La lutte contre les infections à rotavirus constitue de longue date un impératif de santé publique. C'est en effet 111 millions d'enfants qui sont atteints chaque année dans le monde d'une infection à rotavirus, et 400 à 600 000 d'entre eux en décèdent, notamment dans les pays de l'hémisphère sud. L'infection, dans le nord, se limite à une grave déshydratation imposant l'hospitalisation du nourrisson. En France, le rotavirus occasionne chaque année plus de 300 000 diarrhées aiguës saisonnières (entre novembre et avril) chez des enfants âgés de moins de 5 ans, dont quelques 160 000 épisodes sévères conduisant à 18 000 hospitalisations et à une dizaine de décès. Le premier pic de gastroentérites sévères à rotavirus se situe avant l'âge de six mois, d'où la nécessité d'une vaccination très précoce.

Calendrier des vaccinations

J.-A. NICOLAS, C. BOSGIRAUD
Laboratoire de microbiologie, UFR de pharmacie, Limoges.
D. RICHARD, Pharmacie, centre hospitalier Henri Laborit, Poitiers (révision 2007).

les conséquences immunitaires de la maladie naturelle. Une seule administration vaccinale est de ce fait en général nécessaire. La qualité de l'immunisation obtenue se rapproche de celle déterminée par l'infection naturelle et fait de celle-ci la meilleure des vaccinations.
La vaccination peut être effectuée à partir d'une anatoxine, lorsque la toxicité du germe est l'élément essentiel de la maladie infectieuse. Il en est ainsi dans le cas du tétanos, de la diphtérie. On n'immunise pas contre le germe mais contre sa toxine, aux moindres frais. La qualité de la vaccination va de pair avec la précision de la sollicitation antigénique effectuée.
La vaccination peut être effectuée avec des fractions de corps bactériens ou viraux très immunogènes, voire avec des fractions obtenues par synthèse, enfin se développent les mises au point de vaccins obtenus par génie génétique (hépatite B).
Les vaccinations peuvent être associées chaque fois que la nature des vaccins le permet. Ce sont toujours des associations d'anatoxines entre elles ou avec des vaccins tués, avec des fractions sous-unités ou des vaccins vivants entre eux.
Ces associations ne sont pas toujours possibles. Il est donc important de prévoir plusieurs étapes et par conséquent, un certain ordre chronologique lorsque l'on veut immuniser un individu contre diverses maladies. Cette immunisation étant souhaitable dès l'enfance, le calendrier des vaccinations doit également tenir compte de l'aptitude de l'enfant à réagir à la stimulation vaccinale ; cette aptitude est précoce, à partir de 2 mois. L'établissement de ce calendrier doit aussi considérer les diverses périodes de la vie où l'individu demeure exposé aux différentes maladies.
Les vaccins adsorbés : leur principe est de renforcer leur pouvoir antigénique par l'emploi de substances adjuvantes appropriées (sels d'aluminium par exemple).

II. Historique

C'est à Edward Jenner que l'on doit, en 1796, la première tentative de vaccination systématique contre la variole.
Tout en ayant découvert et appliqué, pour la première fois, la plus profitable des réactions croisées, il était loin de soupçonner les finesses de l'immunologie fondamentale actuelle. Il a fallu, en réalité, attendre un siècle pour pouvoir aborder et comprendre le problème de la vaccination grâce à Louis Pasteur. Ce dernier a démontré non seulement l'origine des maladies infectieuses, mais a prouvé que l'on pouvait se protéger contre elles par l'injection de germes atténués déterminant une maladie bénigne inapparente, laissant une immunité active solide et durable.
Mais l'étape décisive de l'immunisation humaine fut franchie lorsqu'en 1885, Pasteur appliqua, pour la première fois, au petit Joseph Meister sévèrement mordu par un chien, le premier traitement antirabique en postexposition, par un vaccin cultivé sur moelle de lapin ayant déjà fait ses preuves chez le chien.
En 1896, Wright expérimente chez l'homme le premier vaccin tué antityphoïdique et, en 1915, Widal suggère l'emploi d'une vaccination triple associant au bacille d'Eberth les bacilles paratyphoïdiques A et B.

B. Dynamique de la formation des anticorps

L'injection d'un vaccin pour la première fois entraîne, après une période de latence plus ou moins longue, la production d'anticorps à un taux faible. Lors d'un contact ultérieur avec le même antigène, la réponse est particulièrement rapide et intense ; il s'agit alors d'une réaction anamnestique due à la présence des cellules sensibilisées ayant gardé la mémoire antigénique.

1. Réponse primaire

Les réactions primaires sont celles observées après la première injection vaccinale par opposition aux réactions secondaires qui sont observées lors de la répétition des injections de rappel.

Schématiquement, après une première injection vaccinale, on peut distinguer trois périodes :

- *La période de latence* qui se situe entre l'injection vaccinale et l'apparition des anticorps sériques. Cette période varie entre 24 heures et 2 semaines, en fonction du développement du système immunitaire du sujet ainsi que de la nature, de la forme, de la dose de l'antigène utilisé et de la voie d'administration.
- *La période de croissance* : dès la fin de la période de latence, le taux des anticorps croît de façon exponentielle ; il atteint son maximum en un temps variable allant de 4 jours à 4 semaines. Cette période est approximativement de 3 semaines pour l'anatoxine tétanique ou diphtérique et de 2 semaines pour les vaccins bactériens. En général, la production d'anticorps IgM précède celle des IgG. Le taux d'anticorps peut rester élevé en plateau pendant quelques jours.
- *La période de décroissance* : après avoir atteint la concentration maximale, le taux des anticorps décline d'abord rapidement puis lentement. La période de décroissance est plus ou moins longue ; elle dépend à la fois du taux de synthèse des anticorps et de leur dégradation, de leur qualité et de leur quantité. Les IgA et les IgM décroissent plus rapidement que les IgG.

2. Réponse secondaire

La réintroduction du même antigène vaccinal après un délai convenable déclenche une réponse de type secondaire, caractérisée par la rapidité d'apparition des anticorps spécifiques et par la quantité importante des anticorps sécrétés qui sont d'emblée de type IgG. Le taux maximum d'anticorps est atteint en quelques jours. La phase d'augmentation reste exponentielle mais sa croissance est plus rapide, alors que la phase de décroissance est plus prolongée.

On note, par ailleurs, une baisse momentanée du taux des anticorps, suivie d'une réascension si la deuxième injection intervient avant la disparition des anticorps induits par la première injection. Les anticorps présents dans le sérum à un taux encore élevé masquent les antigènes administrés ; ainsi, une deuxième stimulation antigénique très rapprochée de la première peut être inefficace du fait de l'élimination de l'antigène par les anticorps sériques encore présents à une concentration importante.

Les anticorps correspondant à la réponse secondaire vont persister beaucoup plus longtemps, parfois indéfiniment.

Le fait important de la réponse secondaire est dû à la présence d'une population de lymphocytes à mémoire qui sont stimulés par la molécule immunogène et se différencient en cellules sécrétrices d'anticorps. Les phénomènes de mémoire immunologique existent pour les deux types de lymphocytes T et B. La réponse secondaire s'observe avec un maximum d'intensité lors de stimulations ultérieures, si l'on augmente les doses d'antigènes. La mémoire immunologique persiste très longtemps chez l'homme même quand la concentration sérique d'anticorps est descendue en dessous du seuil de détection. Elle dépend de la qualité et de la quantité de l'antigène inoculé ainsi que, comme nous l'avons vu, du rythme des stimulations.

C. Facteurs intervenant dans la réponse vaccinale immunitaire

L'efficacité d'un vaccin dépend de plusieurs facteurs :
- le receveur de l'antigène vaccinal ;
- la nature et la dose d'antigène administré ;
- la voie d'administration du vaccin ;
- l'utilisation ou non d'un adjuvant.

D'autres facteurs liés à l'hôte interviennent tels que l'âge, la constitution génétique, l'état nutritionnel et l'immunocompétence ou l'immunodépression du sujet, ainsi que la présence d'une pathologie concomitante.

1. Le receveur de l'antigène vaccinal

- Les gènes de contrôle de la réponse immunitaire sont :
  - les gènes qui codent les molécules de classe II du CMH exprimés par les cellules présentatrices de l'Ag (lymphocytes B, macrophages, cellules dendritiques). Ces molécules sont variables d'un individu à l'autre (allo-antigènes) ;
  - les gènes codant les molécules d'immunoglobulines ;
  - les gènes codant les protéines du complément et les cytokines ;
  - les gènes codant les IgE responsables d'hypersensibilité immédiate.

  Ainsi y aura-t-il des sujets bons ou mauvais répondeurs à la stimulation antigénique.
- Le nouveau-né et l'enfant de moins de 2 ans :

  Les immunoglobulines présentes dans la circulation à la naissance sont essentiellement des IgG d'origine maternelle constituées surtout par des anticorps antiviraux et antibactériens qui ont un rôle protecteur majeur dans les premiers mois de la vie.

  Ces anticorps disparaissent chez certains enfants dès l'âge de 5 mois tandis que chez d'autres, un taux faible peut persister jusqu'à l'âge de 9 mois, parfois jusqu'à un an. Il existe une corrélation entre le titre d'anticorps transmis et sa persistance au cours des premiers mois de la vie.

  L'âge de la vaccination doit donc tenir compte de la disparition des anticorps passifs d'origine maternelle, surtout en ce qui concerne les vaccins vivants atténués : rougeoleux, rubéoliques ou ourliens ; à rapprocher des anticorps maternels, les anticorps transmis par le lait maternel qui ont été rendus responsables de certains échecs de vaccination poliomyélitique par voie buccale. En fait, seul le colostrum contient une quantité importante d'anticorps.

Les données immunologiques montrent cependant que l'enfant est apte à s'immuniser très tôt ; il n'y a donc aucune raison de repousser les vaccinations qui peuvent débuter dès le 2e mois de la vie, sauf pour les vaccins vivants atténués. Il est cependant important de déterminer l'âge le plus favorable pour chaque vaccination en tenant compte d'une part, de l'épidémiologie des maladies, de la période de la vie où l'enfant y est le plus exposé et, d'autre part, de la plus ou moins grande aptitude de l'enfant à réagir à la stimulation vaccinale.

- L'âge de l'adulte : après 60 ans, la réponse immunitaire s'affaiblit avec une diminution de la production d'Ac.
- Les états pathologiques : les affections comportant une immunodépression, une insuffisance rénale chronique, le Sida, l'alcoolisme, les traitements immunosuppresseurs, la dénutrition… sont autant de circonstances diminuant la réponse à l'antigène vaccinal.

2. La nature et la dose de l'antigène

La première qualité d'un bon vaccin est d'être fortement antigénique, c'est-à-dire capable d'exercer une bonne stimulation, d'où la nécessité, pour les laboratoires de production, de procéder à une sélection des souches les plus antigéniques. Par ailleurs, la qualité antigénique des vaccins varie dans une très large mesure selon qu'ils sont constitués de germes ou de virus vivants atténués ou inactivés tués, ou de sous-unités.

La structure de l'antigène, notamment sa taille, sa constitution chimique, sa configuration ainsi que son état physique interviennent dans la réponse immune. L'antigène est d'autant plus immunogène que la molécule qui le porte est soit agrégée, soit particulaire.

Les Ag polysaccharidiques activent directement les lymphocytes B et sont thymo-indépendants, c'est-à-dire qu'ils sont incapables d'être captés par les macrophages et ne sont pas amplifiés par la coopération entre lymphocytes B et T. Ainsi, la réponse immunitaire aux Ag polysaccharidiques est directement liée à la maturation des lymphocytes B dont les récepteurs membranaires n'atteignent leur maturité que vers l'âge de 18 mois. Pour solliciter l'immunité thymo-dépendante et les rendre immunogènes avant l'âge de 2 ans, on les lie de façon covalente à une protéine porteuse (par exemple, l'anatoxine tétanique ou la protéine de membrane externe du méningocoque). C'est ainsi que le vaccin contre l'*Haemophilus influenzae* type b est administrable dès l'âge de 2 mois, conjugué à l'anatoxine tétanique.

Les Ag protéiques vaccinaux comportent des déterminants antigéniques B et T. Les lymphocytes B reconnaissent directement un Ag protéique ; les lymphocytes T le reconnaîtront s'il est dégradé au stade de peptides par les cellules présentatrices d'antigène (macrophages et cellules dendritiques). Ces peptides s'associent alors aux molécules de classes I et II du CMH portées par ces cellules présentatrices d'Ag, et seront présentés aux lymphocytes T.

La dose d'antigène administrée peut influencer la réponse anticorps. Ainsi, par exemple, la vaccination des hémodialysés contre le VHB (HB Vax Pro®) est administrée à la dose de 40 µg/mL d'Ag HBs, au lieu de 10 µg/mL pour l'adulte immunocompétent et de 3 µg/mL pour le nourrisson.

Le mode de préparation du vaccin est également à prendre en considération. Il y a en effet deux grands types de vaccins : ceux où l'antigène vaccinal est à l'état brut

rabique selon les recommandations de l'OMS, et elle doit être impérativement effectuée dans un centre antirabique sous contrôle médical.
- Immunoglobulines tétaniques (Immunoglobulines tétaniques équines Pasteur® 15 000 UI, Gammatétanos®). Elles sont indiquées en cas de tétanos déclaré et de blessures récentes avec risque de contamination par des spores de *Clostridium tetani* chez un sujet non vacciné au cours des dix dernières années, ou dont le schéma de vaccination antérieur est inconnu ou incomplet. Si elles doivent être administrées en association avec le vaccin tétanique, l'administration ne doit pas se faire dans la même seringue que le vaccin. Vaccin et immunoglobulines doivent être administrés en deux endroits différents (côtés controlatéraux).
- Immunoglobulines anti-HBs (Ivhebex®). À la dose de 5 000 UI/mL en IV, elles sont administrées dans le cas de posttransplantation hépatique. En IM sous deux dosages, 500 UI/mL ou 100 UI/mL, elles sont administrées en association avec le vaccin en cas d'exposition accidentelle au VHB et chez les nouveau-nés de mère antigène HBs positif.
- Immunoglobulines polyvalentes (Octagam®, Tégéline®, Endoglobuline®, Gammagarde®...). Elles sont utilisées comme traitement de substitution dans les déficits immunitaires et comme traitement immunomodulateur. Elles peuvent entraver l'efficacité de vaccins viraux vivants. Il faut attendre au moins 6 semaines après la perfusion des Ig polyvalentes avant d'administrer un vaccin à virus vivant.

IV. Associations vaccinales

Un vaccin idéal peut être défini comme étant un vaccin hautement antigénique, totalement efficace en une seule injection, n'occasionnant aucune réaction secondaire et déterminant une immunité postvaccinale solide et durable tout au long de la vie chez 100 % des sujets vaccinés.
Cet aspect du « vaccin idéal » est loin d'être acquis.
Pour être efficaces, la plupart des vaccins, sauf certains vaccins viraux à virus vivant atténué, nécessitent plusieurs injections et plusieurs rappels pour déterminer une protection durable. Afin de simplifier le calendrier des vaccinations, il est particulièrement intéressant d'associer les vaccins, c'est-à-dire de vacciner en une seule fois le maximum de sujets contre le maximum de maladies.

Schématiquement, en matière d'associations vaccinales, on distingue deux types de vaccinations *(tab. 1, 2 et 3)* :
- la vaccination combinée : les vaccins sont mélangés dans la même seringue et sont inoculés en un seul point de l'organisme ;
- les vaccinations simultanées : les vaccins sont administrés en des points différents de l'organisme ou par des voies différentes : intradermique, intramusculaire, sous-cutanée ou par scarification. Pour qu'une association vaccinale soit valable, elle doit être :
  - *efficace* : dans ce cas, la réponse immunitaire de chaque composante doit être au moins égale à celle du vaccin administré seul. Dans certains cas, il peut y avoir synergie antigénique et les résultats sont meilleurs que lorsque les vaccins

soit en fonction de leurs comportements, soit en fonction d'une exposition particulière.
Le schéma vaccinal unique recommandé comprend 3 injections : 0-1-6, avec un intervalle d'au moins un mois entre la 1re et la 2e injection, et un intervalle compris entre 5 et 12 mois entre le 2e et la 3e injection.
Lorsqu'une immunité doit être rapidement acquise, un schéma adapté à certains cas particuliers inclut 3 doses rapprochées : 0-1-2 et une 4e dose un an plus tard.
Au-delà des 3 injections du schéma initial (0-1-6), les rappels systématiques ne restent recommandés que dans des situations particulières.
Chez les insuffisants rénaux chroniques dialysés, une sérologie annuelle est recommandée avec rappel dès que le taux d'anticorps descend au-dessous du seuil protecteur. Chez les professionnels de santé visés par l'article L. 10 du Code de santé publique vaccinés après l'âge de 25 ans et les personnes à haut risque d'exposition, un contrôle de l'immunité par le dosage des anticorps anti-HBs doit être réalisé. Si le taux d'anticorps anti-HBs est supérieur à 10 UI/L, aucun rappel n'est à prévoir. Mais si le taux est en dessous de 10 UI/L, le rappel à 5 ans doit être effectué.

4. Vaccination contre la grippe

La vaccination contre la grippe est recommandée chaque année pour les personnes âgées de 65 ans et plus. La vaccination est également recommandée aux professionnels de santé et tout professionnel en contact régulier et prolongé avec des sujets à risque ; elle est aussi recommandée aux personnes atteintes de certaines pathologies à risque.

5. Autres vaccinations circonstancielles

- La vaccination contre *la typhoïde* est recommandée pour les personnels de laboratoire : une injection et revaccination tous les 3 ans. À partir de l'âge de 2 ans, elle est conseillée aux voyageurs en zone d'endémie.
- La vaccination contre *l'hépatite A* : elle est recommandée dans les cas suivants : sujets exposés ou exposant professionnellement à un risque de contamination, personnels de crèches, d'internat ; personnels de traitement des eaux usées, personnels impliqués dans la préparation alimentaire en restauration collective. Les adultes non immunisés et les enfants au-dessus de un an voyageant en zone d'endémie peuvent être vaccinés.
- La vaccination contre *la leptospirose* : elle est recommandée aux égoutiers, employés de voirie, gardes-pêche, travailleurs agricoles, en particuliers des rizières, personnels de traitements des eaux usées.
- La vaccination contre *la rage* : elle est recommandée aux services vétérinaires, personnels de laboratoires manipulant du matériel contaminé ou susceptible de l'être, équarrisseurs, personnels des fourrières, naturalistes, taxidermistes, gardes-chasse, gardes forestiers, personnels des abattoirs.
- La vaccination contre *les infections à pneumocoque* : elle est recommandée tous les 5 ans pour les sujets splénectomisés, les drépanocytaires homozygotes, les patients atteints de syndrome néphrotique, les insuffisants respiratoires, les patients alcooliques avec hépatopathie chronique, les insuffisants cardiaques et les sujets ayant des antécédents d'infection pulmonaire ou invasive à pneumocoque.

VII. Les réactions vaccinales

Elles sont réduites au minimum si l'on respecte les indications, les contre-indications, et si l'on prend un certain nombre de précautions.
Avant toute vaccination, qui est un acte médical, il convient d'observer des précautions d'ordre général : examen médical préalable, prise de température, interrogatoire des antécédents allergiques, infections récidivantes, recherche d'albumine, de glycosurie, d'acétonurie.
Certains vaccins sont anodins comme l'anatoxine tétanique, les vaccins antipoliomyélitiques, le vaccin antimorbilleux. D'autres sont agressifs comme l'antidiphtérique, l'anticoquelucheux.

L'application du vaccin doit être conforme aux techniques recommandées par les circulaires ministérielles et reproduites sur les notices jointes à l'ampoule de vaccin. On peut décrire cinq types de réactions vaccinales :

- *la réaction locale* : rougeur, œdème, douleur et gêne fonctionnelle, ne dépassant pas 24 heures et ne justifiant aucun traitement ;
- *les réactions générales* : fièvre, courbature, parfois troubles digestifs, débutent le jour même de la vaccination et s'estompent entre 2 et 4 jours. Le repos, la diète hydrique, la prescription d'antihistaminiques suffisent dans tous les cas ;
- *le choc vaccinal* précoce, qui est un choc anaphylactique exceptionnel, avec collapsus cardio-vasculaire, nécessite l'injection immédiate de 1 mg d'adrénaline par la voie sous-cutanée profonde, suivie de l'injection intraveineuse d'hémisuccinate de cortisone et du rétablissement du contenu vasculaire par perfusion de sang, de solutés divers ;
- *les réactions d'organes*, rarissimes, comme l'encéphalite après vaccination antirabique ;
- *les réactions focales*, que constitue la réactivation d'un eczéma, d'un asthme, et que l'on traite comme une crise habituelle. Il faut distinguer de ces réactions vaccinales proprement dites les réveils de maladies latentes révélées par la vaccination : réveil d'un paludisme, d'une colibacillose, d'une tachycardie paroxystique, d'une tare organique, raccourcissement du temps d'incubation d'une maladie infectieuse, toutes manifestations qui ne sont pas imputables directement au vaccin.

On peut en définitive retenir l'insignifiance des accidents vaccinaux, la rareté des complications sérieuses, que l'on doit opposer au fait que les vaccins permettent d'obtenir une immunité sans payer la rançon de la maladie.

Conclusion

Les renseignements concernant la posologie, le nombre et le rythme des injections, l'apparition de l'immunité et le résultat de chaque vaccination figurent dans le calendrier vaccinal et le *Vidal*.
Les effets bénéfiques des vaccinations ne sont plus à démontrer. L'immunité individuelle ne peut se concevoir que dans le cadre de l'immunité collective à l'échelle mondiale.

Les PEV mis en place par l'OMS ont déjà porté leurs fruits. Si la variole est éradiquée de la planète depuis 1979, d'autres infections sont en voie de l'être dans les pays industrialisés (poliomyélite, diphtérie, coqueluche par exemple), mais les efforts doivent être soutenus dans les pays en voie de développement où la mortalité infantile est encore importante (rougeole), et où les MST (maladies sexuellement transmissibles) et les mesures d'hygiène individuelle sont loin d'être maîtrisées.

L'essentiel de la question

Un vaccin est une préparation capable d'apporter à un sujet réceptif à une maladie une protection immunitaire vis-à-vis de cette maladie. Le but est d'obtenir une immunité aussi efficace que l'immunité naturelle apparue après infection par l'agent pathogène responsable de la maladie infectieuse d'origine bactérienne ou virale.

Depuis la première tentative de vaccination contre la variole par Jenner en 1796, la vaccinologie a fait d'énormes progrès dont le plus important est l'éradication de la variole de la planète en 1979.

Les vaccins agissent en tant qu'antigènes. Les mécanismes de l'immunité acquise par vaccination sont analogues à ceux développés par l'organisme lors des infections naturelles par les bactéries ou les virus. La réaction immunitaire déclenchée par un vaccin se manifeste d'abord par une réponse primaire, puis par une réponse secondaire liée à la réintroduction du même antigène vaccinal (rappel) après un délai convenable.

L'efficacité d'un vaccin dépend de plusieurs facteurs : du receveur de l'antigène vaccinal, de la nature et de la dose de l'antigène (antigène polysaccharidique ou protéique), de la voie d'administration (injectable ou orale) et de la présence ou non d'un adjuvant.

La constitution des vaccins se formule sous forme soit de germes vivants atténués, soit inactivés, soit d'anatoxines, soit encore de sous-unités antigéniques.

Ils se présentent sous forme unitaire monovalente ou sous forme de plusieurs antigènes vaccinaux associés (bi, tri, tétra ou pentavalents), ce qui facilite leur utilisation dans le calendrier vaccinal.

Dans le calendrier vaccinal de l'enfant figure trois vaccinations obligatoires : vaccination contre la poliomyélite, la diphtérie et le tétanos (cas particulier pour la tuberculose puisque depuis 2007, la vaccination n'est obligatoire que chez les enfants à risque).

Les derniers protocoles de vaccinations recommandées sont :

- celles contre la rougeole, les oreillons et la rubéole dès l'âge d'un an avec un rappel entre 13 et 24 mois ;
- dès l'âge de 2 mois, la vaccination contre l'hépatite B sans rappel, après 5 ou 10 ans si elle a été pratiquée dans la jeune enfance ;
- un 1er et un 2nd rappel de vaccin contre la coqueluche est recommandé entre 16 et 18 mois et entre 11 et 13 ans respectivement avec le vaccin acellulaire ;
- entre 16 et 18 ans, ne pas oublier de faire les rappels tétanos-polio tous les dix ans ;
- la vaccination contre la grippe est conseillée à partir de 65 ans.

Des programmes de rattrapage de vaccination sont prévus selon les cas de figure.
Pour les professionnels de santé et autres professionnels particulièrement exposés à certains risques, certains vaccins sont obligatoires (BCG, VHB, grippe, poliomyélite) et d'autres recommandés (typhoïde, VHA, leptospirose...).
Les contre-indications définitives aux vaccinations sont relativement rares (néphropathie chronique, affections neurologiques...).
Les contre-indications temporaires sont à respecter pour éviter tout accident vaccinal (infection aiguë, néphropathie aiguë, allergie...).
Les conditions de fabrication des vaccins actuels se sont beaucoup améliorées de façon à limiter les réactions postvaccinales : réaction locale, générale ou focale.
Les effets bénéfiques des vaccinations ne sont plus à démontrer. Les programmes élargis de vaccinations (PEV) mis en place par l'OMS visent à limiter puis à éradiquer à plus ou moins long terme plusieurs maladies infectieuses dont la mortalité touche surtout les populations des pays en voie de développement.


Hidden page

Les antiseptiques

D. RICHARD , Pharmacie, centre hospitalier Henri Laborit et université, Poitiers.

L'usage de médicaments ayant un pouvoir antiseptique remonte à l'Antiquité. Hippocrate recommande l'utilisation de vinaigre et de vin pour traiter les blessures. En 1750, pour la première fois, Pringle employa le terme d'« antiseptique ». Peu après, Labarraque recommanda de traiter les infections superficielles par une solution d'hypochlorite de sodium qui a depuis conservé son nom (liqueur de Labarraque). L'efficacité des hypochlorites fut relevée par Semmelweis afin de prévenir la transmission manuportée des germes responsables d'épidémies d'infections puerpérales. Puis Pasteur et Koch établirent les bases raisonnées de l'asepsie et de l'antisepsie, mises immédiatement en application par le chirurgien Lister notamment.

I. Généralités

A. Définitions

L'*antisepsie* est, selon l'Afnor (NF 72-101, 1973), une opération au résultat momentané qui consiste à détruire par divers procédés physiques et chimiques les micro-organismes et/ou à inactiver les virus présents au moment de l'opération au niveau des tissus vivants, dans la limite de leur tolérance. Elle n'aboutit pas forcément à la stérilité puisqu'elle élimine la majorité mais non la totalité des germes susceptibles de contamination.
Les *antiseptiques* sont donc des produits destinés à être appliqués sur les tissus vivants, dans la limite de leur tolérance, afin d'en éliminer la flore bactérienne contaminante dans un but curatif ou préventif. Cela les distingue radicalement des désinfectants irritants, caustiques, réservés à la désinfection des milieux inertes (matériel, surfaces, locaux).
Cependant, on retiendra que certains produits pourront être considérés soit comme des antiseptiques, soit comme des désinfectants selon leur concentration et leurs conditions d'utilisation. Les termes de *décontamination* et de *sanitisation* sont à éviter car trop peu précis selon l'Afnor.

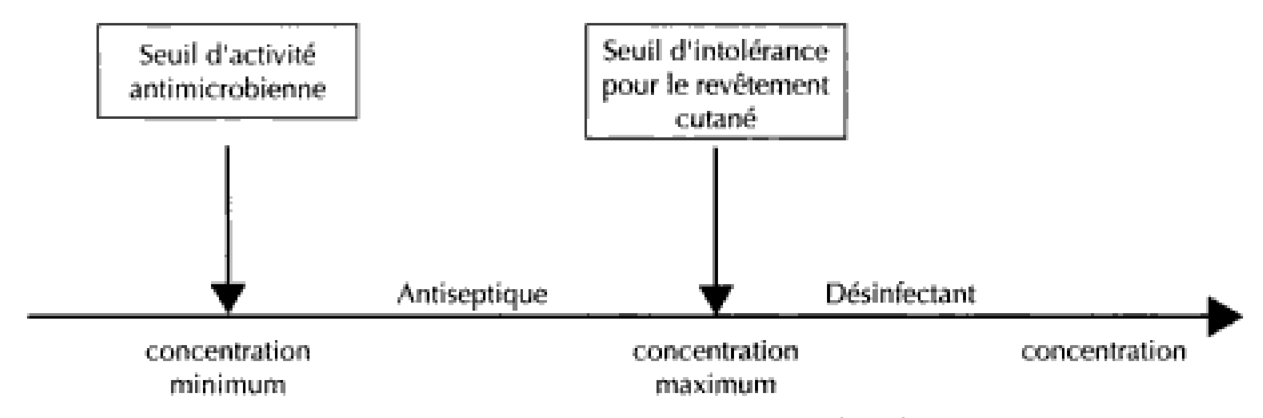


Figure 1. Antiseptique et désinfectant (ADPHSO)

B. Spectre d'activité

L'activité sur la cellule bactérienne est peu spécifique, ce qui implique que l'antisepsie condamne aussi bien les espèces pathogènes que la flore normale. On observe généralement des variations d'activité sensibles suivant le produit utilisé. Il existe ainsi des différences entre l'activité sur les germes Gram positifs et Gram négatifs, et le gain à l'encontre des germes du groupe CNM (*Corynebacterium*, *Nocardia*, Mycobactéries) n'est pas toujours très net. Dans certains cas, il faudra atteindre aussi les dermatophytes et les levures (*Candida albicans*). Quant à l'activité antivirale, elle ne saurait être requise que dans des cas tout à fait spécifiques. Dans tous les cas, il n'est pas question de pouvoir respecter la flore normale mais, en pratique, toute flore transitoire doit être éliminée.

C. Mode d'action

Le premier stade de l'action est la fixation à la surface de la bactérie, la quantité fixée variant plus ou moins suivant la concentration et la nature de l'antiseptique. Le mécanisme le plus important se situe au niveau de la membrane cytoplasmique bactérienne, avec :
- une altération des structures responsable d'une fuite extra-cellulaire des éléments vitaux (électrolytes, éléments de l'ADN…) et une lyse bactérienne ;
- une dénaturation et une coagulation des protéines cytoplasmiques.

Il existe également une action sur le métabolisme cellulaire, en particulier sur le système respiratoire qui peut être bloqué, ainsi que sur d'autres systèmes vitaux.
Suivant les molécules, on peut en effet observer deux types d'effet :
- un effet létal irréversible : bactéricidie, fongicidie, plus rarement virucidie ;
- un effet bactériostatique et fongistatique qui peut parfois s'avérer suffisant.

Certains antiseptiques exercent ces deux effets à la fois suivant la concentration utilisée (chlorhexidine, ammoniums quaternaires), la bactériostase assurant un effet rémanant intéressant puisqu'il y a inhibition plus ou moins prolongée de la multiplication bactérienne par les traces résiduelles d'antiseptique.
Comme avec les antibiotiques, quelques espèces présentent une résistance naturelle à certains antiseptiques : c'est le cas des mycobactéries avec les ammoniums quaternaires par exemple.
En ce qui concerne les phénomènes de résistance acquise, quelques souches sont réputées subsister assez durablement dans les solutés (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, etc.) et engendrer des infections nosocomiales. Cette résistance plasmidique serait due en partie à une réduction de la perméabilité de la membrane à l'antiseptique et concernerait surtout les germes Gram négatifs.

D. Mesure de l'activité des antiseptiques

De nombreux facteurs interviennent sur l'activité, tels le temps du contact et la concentration de l'antiseptique. Il est donc indispensable de standardiser les divers paramètres pour évaluer l'intérêt exact d'un antiseptique (diffusion, rémanence, activité).

2. Mode d'action et spectre

La chlorhexidine dégrade les parois bactériennes en entraînant une fuite des électrolytes, puis, à doses plus fortes, elle coagule *in situ* les protéines et les acides nucléiques.
Le spectre de ce produit est large, mais essentiellement bactérien. L'action sera seulement bactériostatique (concentrations variant de 1 à 15 mg/mL). Les mycobactéries sont résistantes, comme les virus et les spores. Quelques Candida et quelques dermatophytes sont inégalement détruits.

3. Effets indésirables

Même appliquée sur une peau lésée, la chlorhexidine n'expose pas à des risques de toxicité générale. De toute façon, il s'agit d'un produit peu toxique chez l'homme. La peau supporte aisément des solutions titrant 1 % ou plus, mais les muqueuses et les séreuses sont souvent irritées dès que cette concentration excédera 0,02 %. Il faut absolument proscrire toute application sur les méninges, le cerveau et un tympan lésé. Les réactions les plus courantes consistent en des dermites allergiques et des accidents de photosensibilisation.

4. Utilisation pratique

La chlorhexidine est très utilisée, seule ou en association avec des ammoniums quaternaires : solutions aqueuses (Biseptine®, Hibidil® pour les plaies) et hydro-alcooliques (Hibitane® pour les champs opératoires), solutions moussantes (Hibiscrub®), collyres et solutions ophtalmiques, solutions pour lentilles cornéennes, gouttes auriculaires (Auristan®), collutoires et bains de bouche (Eludril®, Pivalone®, etc.).

C. Composés phénoliques

1. Propriétés physico-chimiques

Il existe de nombreux phénols utilisés en thérapeutique mais, dans le cadre de ce travail, nous retiendrons les chlorophénols, les esters d'acides phénols et les bisphénols. Nous n'évoquons pas les molécules utilisées comme agents conservateurs. Les phénols sont généralement peu hydrosolubles, sauf en milieu alcalin (phénates), mais alors leur activité est diminuée. Ils sont inactivés par réaction avec de nombreux composés.

2. Mode d'action et spectre

Les phénols, suivant le cas, sont bactéricides ou simplement bactériostatiques. Dans tous les cas, ils agissent par leur(s) fonction(s) hydroxylique(s). Ils altèrent les membranes cellulaires, avec fuite des électrolytes, à faible concentration mais, à doses plus fortes, ils pénètrent dans la cellule et dénaturent ses systèmes enzymatiques. Les produits les plus actifs, ayant le spectre le plus large, sont aussi les plus toxiques et la plupart ne sont plus utilisés.

Les alkyl-phénols, y compris les dérivés halogénés, ont une excellente activité sur les germes Gram négatifs, sur les mycobactéries et les Candida. Certains sont aussi fongistatiques. Mais leur activité sur les spores est très inégale, du moins à température ordinaire. L'activité sur les virus est discutée. En revanche, les bis-phénols sont essentiellement actifs sur les Gram positifs et les fungi.

3. Effets indésirables

Les phénols sont facilement absorbés par la peau. C'est ainsi que l'hexachlorophène est connu pour s'y accumuler et pour gagner la circulation systémique. En France, en 1972, une série d'accidents neurologiques survenus chez des nourrissons traités par un talc contenant de l'hexachlorophène a entraîné des troubles neurologiques et des lésions cutanées, des décès, et a fait sévèrement réglementer l'usage de ce produit.

4. Utilisation pratique

Les phénols, quels qu'ils soient, sont aujourd'hui peu utilisés : on retrouve de l'hexachlorophène dans quelques savons médicamenteux, et des préparations magistrales peuvent en contenir (glycérines phéniquées, solutions aqueuses de chlorophénol). L'eugénol est toujours utilisé en art dentaire. Les préparations contenant de l'hexachlorophène sont formellement contre-indiquées en application sur des lésions, chez les nourrissons ou les prématurés.

D. Carbanilides

1. Propriétés physico-chimiques

Ce sont des dérivés de la diphénylurée rendus plus actifs par des substitutions halogénées. Le seul produit utilisé en pratique est le triclocarban (Septivon®, Solubacter®). C'est un produit peu hydrosoluble, mais l'on améliore cette solubilité faible en associant la molécule à un tensio-actif tel le PEG 400. La stabilité est fort médiocre et un chauffage, même bref et modéré, libère des chloro-anilines.

2. Mode d'action et spectre

Le triclocarban découple les phosphorylations. L'action, essentiellement bactériostatique, concerne tout particulièrement les germes Gram positifs.

3. Effets indésirables

Le triclocarban ne franchit pas la peau mais les chloro-anilines qu'il libère peuvent, elles, passer dans le sang où elles exerceront une action methémoglobinisante. Ce type particulier de cyanose a été notamment rapporté chez les nourrissons. Les accidents ont souvent été décrits après que du linge lavé avec des adoucissants contenant des carbanilides a été autoclavé alors qu'il subsistait des traces d'antiseptique dans le tissu.

4. Utilisation pratique

Le triclocarban est associé à diverses préparations : pommades, poudres dermiques (Cutisan®), mousse à raser, savons, solutions externes diverses.
On notera que les solutions, même diluées, ne devront pas être utilisées pour la toilette vaginale avant accouchement ni chez le nouveau-né. Bien rincer après utilisation.

E. Éthanol

De nombreux alcools (méthanol, éthanol, isopropanol, alcool benzylique, glycols) manifestent des propriétés antiseptiques mais, compte tenu de la pratique thérapeutique, nous n'évoquons ici que le seul éthanol ou alcool éthylique, le plus largement utilisé.

1. Propriétés physico-chimiques

L'éthanol est soluble dans l'eau en toutes proportions. L'activité des alcools croît avec la longueur de la chaîne carbonée, décroît avec le nombre de ramifications et, pour les molécules aromatiques, est favorisée par une substitution halogénée.

2. Mode d'action et spectre

L'alcool éthylique est bactéricide sur les formes végétatives des bactéries Gram positifs ou négatifs, y compris le bacille tuberculeux (contact minimum de quelques minutes), également fongicide et virucide à l'égard de quelques espèces (les virus des hépatites sont résistants).
À titre indicatif, on peut noter que l'isopropanol et le propanol auraient une activité sur le staphylocoque supérieure à celle de l'éthanol. Il agit en dénaturant les protéines mais cette action requiert de l'eau, ce qui explique que l'alcool absolu soit moins actif que l'alcool à 70°, généralement considéré comme le plus efficace. Inversement, si la dilution est trop importante, l'alcool ne sera plus que bactériostatique et son action sera de ce fait réversible. Sans être sporicide, l'alcool pourra inhiber les enzymes responsables de la germination des spores. L'éthanol exercerait une action lytique sur les mycoplasmes.

3. Effets indésirables

La tolérance est excellente sur la peau, mais il ne faut pas l'appliquer sur les plaies et les muqueuses.

4. Utilisation pratique

L'alcool, particulièrement volatil, s'évapore immédiatement après son application ; son activité antimicrobienne est donc éphémère.
C'est un produit de choix pour réaliser des désinfections cutanées lors d'une ponction veineuse, d'une intra-musculaire ou d'une scarification. C'est aussi un désinfectant idéal pour les surfaces inertes et le petit matériel tels les thermomètres (immersion d'une vingtaine de minutes). Mais en aucun cas l'usage d'éthanol n'entraîne une stérilisation véritable du matériel avec notamment sporicidie.

1. Propriétés physico-chimiques

Si le chlore, le brome et le fluor sont essentiellement utilisés comme désinfectants, l'iode est très largement administré comme antiseptique.
S'agissant du chlore, on aura recours aux *hypochlorites* générateurs d'acide hypochloreux actif ou aux *chloramines* (dont le représentant caractéristique est l'halazone). L'acide hypochloreux est hydrosoluble mais, en pH acide (inférieur à 5), il libère du chlore gazeux qui s'échappera de la solution.

$$Cl_2 + H_2O \rightleftarrows HClO + H^+ + Cl^-$$

En milieu alcalin, HClO a tendance à se dissocier en hypochlorites ClO^- moins actifs.
Le pouvoir oxydant s'exprime en chlore actif. On le quantifie par action des hypochlorites sur l'iodure de potassium avec dosage de l'iode libéré par le thiosulfate de sodium :

$$NaClO + 2\ KI + 2CH_3COOH \rightarrow I_2 + NaCl + 2CH_3COOH + H_20$$

Il est également possible de déterminer le degré chlorométrique correspondant à 3,22 grammes de chlore actif. S'agissant de l'iode, on aura recours à l'iode en solution. Il est peu hydrosoluble mais la présence d'ions iodures facilite l'opération selon l'équilibre :

$$I_2 + I^- \leftrightarrows I^-_3$$

Il est en revanche plus soluble dans divers solvants organiques comme l'alcool. On utilisera aussi des iodophores organiques libérant lentement de l'iode (polyvinylpyrrolidone iodée = PVP-I, ou polyvidone iodée de la Bétadine®). L'intérêt de ces formes liées est qu'elles sont plus stables et moins volatiles que les formes solubilisées.
Il faut éviter de mettre en contact les halogènes avec d'autres produits compte tenu de leur forte réactivité. Les solutions aqueuses seront préparées avec de l'eau osmosée pour éviter l'action d'ions minéraux.

2. Mode d'action et spectre

L'acide hypochloreux et l'iode libre agissent sur les protéines intracytoplasmiques. L'action globale est fortement bactéricide, même à de faibles concentrations et en l'espace de quelques secondes ou quelques minutes suivant les espèces. Seule la présence de matières organiques susceptibles de fixer une partie des halogènes pourra amoindrir cette activité. Le spectre est large et concerne les bactéries (y compris les mycobactéries) à des concentrations de 0,1 %, les fungi (0,1 à 1 %), les virus (1 %) et les spores (1 %).

H. Dérivés métalliques

1. Sels de mercure

a) Propriétés physico-chimiques

Les antiseptiques encore utilisés aujourd'hui et à base de mercure sont tous des organo-mercuriels dont la toxicité est réduite et la tolérance satisfaisante. Il existe des alkyl-mercuriels, dont le type est le mercurothiolate de sodium (merthiolate ou thiomersal), et des aryl-mercuriels tels la mercurescéine sodique ou les sels de phénylmercure, et dont les représentants utilisés en thérapeutique sont nombreux. Les organo-mercuriels sont solubles dans l'acétone ou l'alcool et partiellement solubles dans l'eau. La stabilité est satisfaisante, bien qu'il y ait décomposition lente en milieu acide ou alcalin. Certains de ces composés sont incompatibles avec les dérivés iodés et les halogénures.

b) Mode d'action et spectre

Le mercure se lie aux restes thiols des protéines et des ribosomes. Les dérivés mercuriels, aux concentrations thérapeutiques, sont bactériostatiques et fongistatiques à des taux variant entre 50 et 500 ppm de mercure. Les bactéries sont généralement sensibles à l'exclusion des mycobactéries, ainsi que certains fungi. Virus et spores sont insensibles. Il est important de souligner que la résistance au mercure devient de plus en plus fréquente, qu'elle soit d'origine chromosomique ou plasmidique. Les plasmides de résistance sont mixtes, conférant une résistance aux sels de mercure et à divers antibiotiques. C'est ainsi que les staphylocoques, le pyocyanique et les entérobactéries pourront parfois précipiter *in situ* les sels et volatiliser le mercure. Certains *Penicillium* sont eux-mêmes résistants.

c) Effets indésirables

Aux concentrations normales d'utilisation et dans des conditions standards d'application, aucun signe évident d'intoxication au mercure n'a été relevé, bien que la pénétration cutanéo-muqueuse de ces produits soit suffisante pour permettre de retrouver des quantités mesurables de mercure dans l'organisme. L'élimination se fera principalement par voie urinaire, fécale, lacrymale et salivaire. Les dérivés alkyl-mercuriques sont très dangereux (toxicité neurologique) dès qu'ils sont inhalés ou ingérés. Par voie cutanée, ils sont sensibilisants et susceptibles d'entraîner un érythème, parfois des éruptions papulaires et vésiculaires. Les dérivés aryl-mercuriques sont moins toxiques, mais susceptibles eux aussi d'induire des dermatoses de contact et des réactions de sensibilisation graves.

d) Utilisation pratique

Les organo-mercuriels ont été naguère très utilisés, en ophtalmologie comme en dermatologie ou en gynécologie (Mercryl®) ; ils sont encore parfois associés comme conservateurs à diverses préparations pharmaceutiques.

2. Sels d'argent

a) Propriétés physico-chimiques

Les sels d'argent utilisés en thérapeutique sont nombreux : argent colloïdal, protéinates d'argent (dans ces deux cas, le sel est associé à des protéines), nitrate d'argent présenté sous forme de « crayons » (obtenus par fusion avec du nitrate de potassium), argent-sulfadiazine, sels organiques (dont l'utilisation est rare).
À l'exception du nitrate, les autres sels évoqués sont insolubles dans l'eau, mais peuvent toutefois donner lentement une solution colloïdale en présence de protéines. La stabilité est satisfaisante mais il y a noircissement à la lumière. Les sels d'argent doivent être protégés du contact des halogénures, des sulfures, des thiols.

b) Mode d'action et spectre

Dans tous les cas, l'activité est le fait des ions Ag^+, qui inhibent les systèmes enzymatiques en se liant avec divers groupes : thiols, carboxyles, phosphates, hydroxyles…
Les germes Gram négatifs sont plus sensibles que les germes Gram positifs. Aux concentrations requises, les produits sont généralement bactériostatiques. Des résistances sont connues. Les substances organiques diminuent fortement l'activité des sels d'argent (facteur 20 à 40).

c) Effets indésirables

L'argent est résorbé par les tissus lésés, notamment chez les brûlés. C'est ainsi que 10 % du complexe argent-sulfadiazine pourra être retrouvé dans le sang après application de Flammazine®.
Les sels d'argent sont irritants pour la peau et la cornée, les protéinates étant toutefois mieux tolérés. Des cas de photosensibilisation et de méthémoglobinémie ont été rapportés.
Il convient aussi, évidemment, de ne pas utiliser d'argent-sulfadiazine chez les sujets sensibilisés aux sulfamides.

d) Utilisation pratique

On administre essentiellement le nitrate d'argent sous forme de collyre à 1 %, l'argent colloïdal sous forme de pommade à 10 %. Les pommades Flammazine® et Flammacerium® contiennent, elles, de la sulfadiazine argentique.

I. Divers

- Quelques acides sont utilisés comme antiseptiques, notamment sous forme de préparations dermatologiques : acide acétique, acide borique, acide lactique, acide tartrique ;
- Des colorants dérivés du triphénylméthane ont été introduits en thérapeutique lors de la Première Guerre mondiale (vert brillant, cristal violet, etc.) ; ils sont relativement peu actifs, utilisés en solution aqueuse ou alcoolique. Le type de ces préparations est la solution de Milian, associant vert de méthyle et cristal violet dans de l'eau ou de l'alcool à 60° ;

dément ancrés. Le rinçage pourra être effectué avec de l'éther. On applique ensuite un produit antiseptique de même nature que celui qu'utilise le chirurgien lors de l'intervention, on rince, on sèche et on protège la zone ainsi traitée avec un linge stérile ou du moins propre. Lors de l'opération, le chirurgien badigeonne le champ pendant environ trois minutes en appliquant le soluté du site de l'incision vers l'extérieur. Suivant la nature du produit, il rince et traite éventuellement à l'éther ou non, avant d'appliquer une nouvelle fois l'antiseptique sans rinçage terminal. On peut parfois procéder par immersion s'il s'agit de la main ou du pied. Les produits les plus couramment utilisés sont l'alcool iodé à 2 %, la PVP iodée, la chlorhexidine en solution à 0,5 % dans de l'alcool à 70° les ammoniums quaternaires en solution alcoolique, les associations type Biseptine®.

B. En curatif

Bien que le rôle des antiseptiques soit secondaire par rapport à celui des antibiotiques, ils sont employés dans le traitement des infections localisées car ils permettent d'éliminer les risques de sensibilisation qui empêcheraient l'usage ultérieur par voie systémique des produits, et les risques de sélection de germes résistants. On réserve donc souvent les antibiotiques au traitement des infections généralisées ou locales mais graves.
Les grands principes d'utilisation valent pour toutes les préparations. Il faut :

- utiliser un produit pour un malade donné, en privilégiant les présentations unitaires, utilisées rapidement ;
- instaurer un traitement limité dans le temps ;
- respecter scrupuleusement le mode d'emploi des solutions ;
- veiller à décaper préalablement toutes les lésions cutanées au moyen d'une compresse imbibée d'eau oxygénée par exemple, ou d'un détergent (savon, ammonium quaternaire) ; bien rincer ensuite et ce d'autant plus que l'on utilise un antiseptique incompatible avec le détergent ;
- proscrire les associations inactives (cationique et anionique) ou toxiques (mercuriel et iodé) ;
- favoriser les associations bactéricides (savons et carbanilides, chlorhexidine et alcool).

1. Traitement d'une plaie

Une plaie propre est traitée comme de la peau saine avant intervention chirurgicale (chlorhexidine alcoolique ou iode).
Une plaie souillée ou anfractueuse est d'abord nettoyée avec une pince (pour retirer d'éventuels corps étrangers) puis avec un détergent, l'opération devant parfois être menée sous anesthésie. Les dérivés iodés et la chlorhexidine sont particulièrement indiqués, ainsi que des irrigations de Dakin.

2. Traitement d'une brûlure

On procède par balnéation, puis on pulvérise des antiseptiques sur les lésions. On peut appliquer des compresses imbibées ou des gels. Les principes actifs sont la chlorhexidine, la PVP iodée, le nitrate d'argent ou l'argent-sulfadiazine.

3. Traitement d'une dermatose infectée

Dans ce cas, il faut privilégier les substances ayant une activité rémanente, notamment les formules magistrales à base d'oxyde de zinc, de sulfate de cuivre (eau de Dalibour), les solutions d'éosine ou de bleu de méthylène. Ces produits sont fongicides et bactéricides mais se conservent mal. La PVP iodée est aussi très utilisée (sauf dans les dermites suintantes), ainsi que la chlorhexidine.

Tableau 1. Activités *in vitro* des principaux antiseptiques

Produits	Bactéries		Mycobactéries	Spores	Champignons	pH d'activité optimum	Ions Ca^{++}	Matières organiques
Iode	+++	+++	++	+	++	9	Peu d'influence	1
Polyvinylpyrrolidone iodée	+++	+++	++	+	++	5 à 8	Peu d'influence	1
Chlore et hypochlorites	+++	+++	++	+	++	5 à 7	Inhibition	
Chlorure de benzalkonium	+++	++	+	0	++	3,7 à 10,9	Inhibition	
Gluconate de chlorhexi dine	+++	++	+	0	+	7	Inhibition	
Triclosan	+	+	+	0	++		Peu d'influence	

Source : Site Internet cité en bibliographie

Tableau 2. Toxicité et précautions d'emploi des principaux antiseptiques

Produits	Contre-indications	Toxicité par voie cutanée	Irrigations des cavités naturelles	Toxicité sur l'environnement
Iodés	Enfants de moins de 30 mois, brûlés à + 20 %	Irritant et allergisant, nécrosant en association	Oui (PVP iodée)	Corrode les métaux, tache
Chlorés		Irritant au-dessus de 5° chlorométriques	Oui	Corrode les métaux
Ammoniums quaternaires		Brûlure avec solution à 10 %, irritation avec solution à 0,1 %, allergisant	Oui	Biodégradable
Mercuriels	Enfants de moins de 30 mois	Irritant à forte concentration, nécrosant en association avec les produits iodés	Non	Toxique pour l'environnement Résistance trouvée avec les antibiotiques
Phénols	Enfants de moins de 30 mois, brûlés	Peu irritant	Non	
Chlorhexidine	Oreille moyenne, cerveau et méninges	Peu irritant	Oui	Corrode les métaux, coloration indélébile avec le linge en coton

Source : Site Internet cité en bibliographie

Les antituberculeux

L. VALLET M.-H. FIÉVET, R. FARINOTTI
Pharmacie, GH Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris.

La tuberculose humaine est une infection bactérienne chronique contagieuse due essentiellement à Mycobacterium tuberculosis ou bacille de Koch (BK). Quelques cas sont dus à Mycobacterium bovis ou Mycobacterium africanum. Cette maladie présente des manifestations très diverses et une ubiquité remarquable.
Connue depuis l'Antiquité, la tuberculose demeure un fléau dans les pays en voie de développement. De par le monde, elle est à l'origine de 3 millions de cas par an dont 300 000 enfants de moins de 15 ans : 95 % des cas se situent dans les pays en voie de développement, l'Asie étant l'épicentre de l'épidémie. En Europe, on a d'abord observé une augmentation des cas déclarés au début des années 1990, puis une décroissance. Ainsi, en France, faisant partie des maladies à déclaration obligatoire, l'incidence de la tuberculose est d'un cas pour 100 000 habitants. En revanche, la situation actuelle devient de plus en plus sombre en Europe de l'Est.
Les modalités de traitement de la tuberculose n'ont guère changé ces dernières années : nécessité absolue d'un traitement prolongé d'au moins six mois reposant sur une association de trois ou quatre antibiotiques en vue de prévenir l'apparition de mutants résistants. En effet, l'enjeu actuel de la prise en charge thérapeutique de la tuberculose est de lutter contre la menace de dissémination de souches de bacilles résistant aux antibiotiques car la mortalité est élevée (27 %) chez les sujets infectés par des bacilles multirésistants. Ce traitement nécessite une bonne observance du patient et une surveillance biologique rapprochée. Il faut rappeler qu'en l'absence de traitement, un tiers des patients mouraient au début du xxe siècle.
Rappel : le BK est un bacille aérobie strict, acido-alcoolo-résistant de culture lente, c'est un parasite intracellulaire facultatif.
Il ne se multiplie qu'une fois toutes les vingt heures, ce qui explique qu'une prise quotidienne des antituberculeux soit suffisante mais également que le traitement soit long.

I. Résistance du bacille de la tuberculose

Le bacille de Koch peut, comme toutes les bactéries, acquérir une résistance aux antibiotiques, celle-ci est de nature chromosomique. Aucun phénomène de résistance plasmidique n'a été démontré jusqu'ici.
On distingue deux types de résistances aux antituberculeux.

A. Résistance primaire

Elle est constatée d'emblée avant tout traitement lors d'une première atteinte. Elle résulte d'une contamination par des bacilles résistants. Sa fréquence varie selon les modalités de traitement, les pays…
En France, la résistance primaire est de 3 % pour l'isoniazide, de 0,05 % pour la rifampicine et nulle pour le pyrazinamide.

B. Résistance secondaire

Elle est acquise en cours de traitement et est due à un traitement mal suivi ou mal prescrit.

À la différence des résistances chromosomiques des autres bactéries, il existe un taux élevé de mutants résistants présents dans les populations bacillaires normales qui, associé à un grand nombre de bacilles présents dans certaines localisations, explique la fréquence d'apparition de résistances en cours de traitement.
Ainsi, la proportion de mutants résistants dans une population bacillaire normale est de :
- 1 pour 10^6 : bacilles pour l'isoniazide ;
- 1 pour 10^6 : bacilles pour l'éthambutol ;
- 1 pour 10^7 ou 1 pour 10^8 : bacilles pour la rifampicine ;
- 1 pour 10^9 : bacilles pour le pyrazinamide.

Le traitement antituberculeux est donc étroitement conditionné par le problème des résistances.
En effet, il faut tenir compte de 3 facteurs principaux :
- le nombre total de BK au sein de la lésion, plus il est important, plus le risque de sélection de mutants est grand ;
- l'activité antibactérienne propre de l'antibiotique ;
- la proportion de mutants résistants existant au sein d'une population de BK.

Ainsi, pour éviter la sélection des mutants résistants, il ne faut jamais traiter une tuberculose active par une monothérapie, il faut d'emblée donner un traitement triple ou quadruple qui sera réduit au bout de 2 ou 3 mois.
Remarque : la multirésistance du BK est définie par la résistance à deux antituberculeux ou plus.
À l'heure actuelle, la tuberculose multirésistante est peu fréquente en France.

II. Étude des principaux antituberculeux

Les antituberculeux utilisés actuellement ont des structures chimiques très variées. Ils peuvent cependant être classés en deux catégories selon leur mode d'action :
- les bactériostatiques (éthambutol, éthionamide) ;
- les bactéricides (isoniazide, rifampicine, streptomycine, pyrazinamide).

Les antituberculeux les plus efficaces (bactéricides) doivent être utilisés préférentiellement ; ils sont prescrits en association pour deux raisons principales :
- la prévention de l'apparition et de l'expression de bacilles résistants. Le développement d'une résistance est d'autant moins probable que le nombre d'antituberculeux est plus grand ;
- la stérilisation de toutes les populations bacillaires : BK à multiplication rapide mais également germes quiescents (intracaséeux et intracellulaires).

A. Isoniazide (INH)

Découvert en 1912, ses propriétés antituberculeuses n'ont été décrites qu'en 1952. L'isoniazide est inscrit à la 10e édition de la Pharmacopée française.

9. Précautions d'emploi

- Prise du médicament le matin à jeun en une seule prise, en traitement continu à la posologie standard de 5 mg/kg/jour, quelle que soit la localisation ;
- Administration de vitamine B6 (pyridoxine) chez les sujets à risques et en cas de neuropathies ;
- Surveillance de la fonction rénale : si clairance de la créatinine inférieure à 20 mL/min, réduction de la posologie ;
- Surveillance de la fonction hépatique : adaptation du traitement en fonction des activités sériques des transaminases (*tab. 2*).

10. Contre-indications

- Antécédent d'hépatite due à l'INH.

Précautions d'emploi :

- hépatite chronique ;
- insuffisance rénale sévère ;
- alcoolisme chronique ;
- grossesse : il ne semble pas exister de risque de malformation.

B. Rifampicine (RMP)

Introduite sur le marché en 1967, la rifampicine a radicalement changé le traitement de la tuberculose. Elle est inscrite à la 10[e] édition de la Pharmacopée française.

1. Présentations

Toutes les présentations de rifampicine sont inscrites sur la liste I.

a) Formes orales

- Rifadine®, Rimactan® : gélules à 300 mg.
- Rifadine® ou Rimactan® suspensions à 2 % : flacons de 24 mesures à 100 mg/mesure.
- Rifater® comprimés : Rifampicine 120 mg – Isoniazide 50 mg – Pyrazinamide 300 mg.
- Rifinah® comprimés : Rifampicine 300 mg – Isoniazide 150 mg.

b) Forme injectable

Rifadine® 600 mg lyophilisat pour perfusion IV.

2. Structure

La rifampicine appartient à la famille des rifamycines. Sa structure chimique comporte un noyau chromogène (naphtohydroquinone), une longue chaîne aliphatique composée de 24 chaînons dans lesquels on note la présence de 5 groupements méthyles.

Figure 2. Structure de la rifampicine

3. Synthèse

Par hémisynthèse à partir de la rifamycine B naturelle extraite du *Streptomyces mediterranei*.

4. Propriétés physico-chimiques

Poudre cristalline rouge brique, peu soluble dans l'eau, soluble dans le méthanol. Spectres IR et UV caractéristiques.

5. Pharmacologie

La rifampicine est un antibiotique bactéricide.

a) Spectre d'activité

Spectre large sur de nombreuses bactéries : *Haemophilus, Brucella, Chlamydia*. Les entérobactéries et les cocci à Gram + et à Gram –.
Elle est active sur *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis* ainsi que sur certaines mycobactéries atypiques au niveau des cavernes, du caséum solide et sur les bacilles intramacrophagiques. Elle agit également, sur les trois populations de bacilles intramacrophagiques intracaverneux et intracaséum.

b) Mécanisme d'action

Blocage de la synthèse d'ARN par fixation sur l'ARN polymérase ADN dépendante.

c) Pharmacocinétique

- Absorption orale bonne mais diminuée par la prise d'aliments. Elle doit donc être prise à jeun ;
- Pic plasmatique : 2 heures après la prise ;
- Diffusion tissulaire bonne dans de nombreux tissus : os, poumons… du fait de sa liposolubilité ;
  Franchit peu la barrière hématoméningée ; on obtient toutefois des concentrations efficaces dans le LCR lors d'inflammation des méninges ;

- Fixation aux protéines plasmatiques : 80 % ;
- Métabolisation : désacétylation au niveau hépatique. C'est un inducteur enzymatique puissant à l'origine de nombreuses interactions médicamenteuses ;
- Demi-vie d'élimination : 2 à 5 heures ;
  Élimination : 70 à 80 % par voie biliaire (cycle entérohépatique) et 10 à 30 % par voie rénale.

d) Dosage dans les milieux biologiques

HPLC.

6. Indications

- Antituberculeux majeur, son association à l'INH reste la clef de voûte du traitement actuel de la tuberculose sous toutes ses formes en raison du faible taux de résistance primaire ;
- Antibiotique à large spectre utilisé en association dans certaines infections sévères à staphylocoques, légionelloses, brucelloses, lèpre…

La rifampicine est l'antibiotique de choix pour la prophylaxie de la méningite à méningocoque.

7. Posologie

10 mg/kg/j chez l'adulte et l'enfant, traitement en curatif ou prophylactique.
Le matin à jeun en 1 prise associée aux autres antituberculeux.

8. Effets indésirables

- *Digestifs :* nausées, vomissements ;
- *Hépatotoxicité :* en monothérapie (en dehors du traitement de la tuberculose), l'hépatoxicité de la rifampicine est modérée, moins de 5 % d'élévation des transaminases, réversible à l'arrêt du traitement. La plupart des toxicités hépatiques sévères ont été observées lorsque la rifampicine est associée à l'INH ;
- Manifestations immuno-allergiques : éruption, fièvre, anémie hémolytique, thrombocytopénie, insuffisance rénale. Ces manifestations sont favorisées par des traitements longs et intermittents ;
- Coloration rouge des urines, selles, larmes, lentilles de contact ;
- Hypersensibilité : très rare.

9. Précautions d'emploi

- Administration continue car un traitement intermittent peut provoquer un phénomène immuno-allergique : cytopénie, insuffisance rénale aiguë ;
- Insuffisance rénale : ne pas modifier la posologie ;
- Insuffisance hépatique : la prescription n'est pas contre-indiquée, toutefois on peut diminuer la posologie en cas d'insuffisance hépatique très sévère ;
- Grossesse : la rifampicine passe la barrière fœto-placentaire et a une action tératogène chez l'animal à doses élevées. Chez la femme enceinte, son administration n'ayant jamais été associée à une action tératogène, la prescription reste possible aux doses usuelles.

10. Interactions médicamenteuses

La rifampicine est un des inducteurs les plus puissants des enzymes hépatiques (cytochromes). Le métabolisme de nombreux médicaments se trouve induit par la rifampicine, entraînant une diminution de la demi-vie et des concentrations plasmatiques de ces médicaments : œstroprogestatifs, antivitamines K, barbituriques, méthadone, antiprotéases rétrovirales, antifongiques imidazolés… Il est donc nécessaire d'ajuster les posologies des médicaments associés.

11. Contre-indications

- Porphyrie ;
- Allergie aux rifamycines.

C. Éthambutol (EMB)

1. Présentations

Toutes les présentations sont inscrites sur la liste I.

a) Formes orales

- Dexambutol® : comprimés à 250 mg et 500 mg ;
- Dexambutol INH® : Éthambutol 400 mg – Isoniazide 150 mg ;
- Myambutol® : comprimés à 400 mg.

b) Forme injectable

Myambutol® 1 g : ampoules de 10 mL.

2. Structure

L'éthambutol est un dérivé de l'éthylène diamine (NN', dihydroxybutyl éthylène diamine) ; le sel utilisé en thérapeutique est le dichlorhydrate du composé dextrogyre.

Figure 3. Structure de l'éthambutol

3. Pharmacologie

a) Spectre d'activité

Limité aux mycobactéries : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium complex* (MAC).

- Surveillance ophtalmologique : interrompre le traitement si troubles de la vision des couleurs. La prescription doit toujours être précédée d'un examen ophtalmologique. Surveillance particulière des malades porteurs de lésions oculaires, des alcoolo-tabagiques, des diabétiques et des malades traités par disulfirame, anti-inflammatoires et antipaludéens de synthèse ;
- Chez le jeune enfant, il faut éviter sa prescription car la mise en évidence d'un trouble de la vision des couleurs est difficile. L'éthambutol peut être prescrit pendant la grossesse.

8. Contre-indications

- Névrite optique ;
- Hypersensibilité connue au médicament.

D. Pyrazinamide (PZA)

Proche de l'isoniazide, le pyrazinamide (PZA) était connu depuis 1952 mais avait été rapidement abandonné en raison de sa toxicité hépatique : des études longues et nombreuses ont conduit à le réhabiliter dans les années 1980.

1. Présentations

Toutes les présentations de pyrazinamide sont inscrites sur la liste I.
Formes orales uniquement :
- Pirilène® comprimés sécables 500 mg (liste I) ;
- Rifater® rifampicine 120 mg – Isoniazide 50 mg – Pyrazinamide 300 mg.

2. Structure

Le pyrazinamide est le pyrazine carboxylamine.

O
N
NH_2
N

Figure 4. Structure du pyrazinamide

3. Pharmacologie

a) Spectre d'activité

Le pyrazinamide est un antituberculeux strict actif sur *Mycobacterium tuberculosis* et sur *Mycobacterium africanum* ; sa particularité est d'être actif uniquement à pH acide sur les bacilles intracellulaires.
Mycobacterium bovis et les autres mycobactéries sont naturellement résistants.

b) Pharmacocinétique

- Absorption : retardée par la prise concomitante d'aliments, il doit donc être pris à jeun ;
- Demi-vie : environ 9 heures ;
- Fixation protéique faible ;
- Métabolisme hépatique : le métabolite principal est l'acide pyrazinoïque qui inhibe la sécrétion tubulaire de l'acide urique, provoquant ainsi des hyperuricémies ;
- Distribution large dans l'organisme y compris dans le système nerveux central ;
- Élimination rénale à 70 %.

c) Dosage dans les milieux biologiques

HPLC, spectrophotométrie.

4. Indications

Traitement de la tuberculose uniquement : son addition à la trithérapie classique (INH, RMP, EMB) a permis de réduire la durée du traitement à 6 mois.

5. Posologie

La posologie du pyrazinamide est de 30 mg/kg/jour en une seule prise le matin à jeun pendant la période initiale de traitement antituberculeux (de 2 à 3 mois).

6. Effets indésirables

- Digestifs (3 à 9 %) ;
- Cutanés (1 à 13 %) : quelques rares cas de rash et de photosensibilisation ont été rapportés ;
- Hépatiques (2 à 3 %) : l'hépatoxicité est renforcée par l'association rifampicine-INH ; une surveillance biologique est donc nécessaire pour prévenir les hépatites avec ictères ;
- Hyperuricémie fréquente pouvant entraîner des arthralgies et plus rarement de véritables crises de goutte (les premières cèdent habituellement à un traitement symptomatique, les secondes doivent être traitées par un uricosurique).

7. Précautions d'emploi

Surveillance de la fonction rénale : réduire la posologie en fonction des activités sériques des transaminases.
Chez le sujet hyperuricémique, surveiller l'uricémie (*cf. tableau* 2).

8. Contre-indications

- Porphyrie ;
- Grossesse ;
- Insuffisance hépatique sévère ;
- Insuffisance rénale sévère.


Hidden page

E. Aminosides

- La kanamycine a une activité bactéricide *in vitro* et *in vivo* sur le bacille tuberculeux mais n'est plus commercialisée en France.
- L'amikacine, de par sa structure voisine, a également une activité sur le BK. Elle est utilisée dans le traitement de la tuberculose à la posologie de 15 mg/kg mais n'a actuellement pas d'AMM dans cette indication.

Comme tous les aminosides, elle est contre-indiquée chez la femme enceinte et l'enfant de moins de 6 ans.
Pour les données de toxicité et de suivi thérapeutique, se reporter au chapitre des aminosides.

F. Acide para amino salicylique (sel de sodium) : PAS

Le PAS est un antituberculeux bactériostatique actif uniquement sur le BK.
Les effets secondaires principaux sont des troubles digestifs (nausées, vomissements et diarrhées) et des réactions d'hypersensibilité (fréquence de 5 à 10 %). Des symptômes d'hypothyroïdie peuvent apparaître à long terme.
La posologie est de 8 à 12 g/jour en 2 ou 3 prises.

G. Rifabutine

Proche de la rifampicine, elle appartient à la famille des rifamycines.

1. Présentation

Forme orale : Ansatipine® : gélules à 150 mg, liste I.

2. Pharmacologie

- Spectre d'activité large ;
- Active sur les bactéries à Gram + et plus faiblement sur les bactéries à Gram – ;
- Active sur le *Mycobacterium tuberculosis* résistant ou non à la rifampicine et sur les mycobactéries atypiques, notamment *Mycobacterium avium complex*.

3. Pharmacocinétique

- Absorption orale bonne ;
- Pénétration intracellulaire élevée ;
- Excellente diffusion tissulaire, particulièrement dans les poumons et le tractus digestif à l'exception du cerveau ;
- Inducteur enzymatique ;
- Fixation protéique : 90 à 95 % ;
- Élimination de la rifabutine et de ses métabolites essentiellement par voie urinaire ;
- La demi-vie d'élimination est de 35 à 40 heures.

d) Tuberculose et VIH

Les règles de traitement sont les mêmes que pour un malade non infecté par le VIH. Une durée totale de 6 à 9 mois est recommandée et peut être prolongée à 12 voire 18 mois. En revanche, la surveillance du traitement sera accrue car les sujets infectés par le VIH ont un risque plus important de développer des phénomènes d'allergie aux antituberculeux : fièvre, éruptions cutanées, cytolyse hépatique.
Il faudra aussi surveiller le risque d'interactions médicamenteuses, notamment avec les antiprotéases.

B. Surveillance du traitement

Une surveillance du traitement est indispensable tout au long du traitement (*tab. 2*). Elle comporte trois impératifs :
- la vérification de l'adhésion du patient durant toute la durée du traitement ;
- le dépistage d'une éventuelle toxicité médicamenteuse ;
- le suivi de l'évolution clinique et bactériologique de la maladie.

Tableau 2. Surveillance minimale d'une tuberculose pulmonaire

	J0	J10 à J15	Mois						
			1	2	3	4	6	9	12
Examens cliniques/consultation	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Examens bactériologiques	*			* Si expectoration			* Si expectoration		
Radiographie du thorax	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Transaminases	*	*		* Si anomalie					
Créatininémie	*								
Uricémie	*								
Examens ophtalmologiques [1]	*	*	*						
Plaquettes	*	*	* Si anomalie						

1. Si EMB prescrit dans l'association

1. Bilan initial

Il devra comprendre des examens cliniques, bactériologiques et radiologiques ; ils ont pour objet de contrôler l'amélioration rapide qui résulte de la prise des antibiotiques. Ils seront poursuivis régulièrement durant toute la durée du traitement.
Des examens biochimiques complémentaires (transaminasémies, créatininémie, uricémie), ainsi qu'un examen ophtalmologique, ont pour but de déceler précocement les accidents toxiques.
La fonction rénale doit être contrôlée au début du traitement car la majorité des antibiotiques sont excrétés par le rein.
La fonction hépatique sera contrôlée également avant traitement (transaminases) car l'isoniazide, la rifampicine et le pyrazinamide sont métabolisés par le foie et peuvent entraîner un certain degré de cytolyse.

Le schéma du traitement standard de la tuberculose est le suivant :
- isoniazide + rifampicine + pyrazinamide + éthambutol pendant 2 mois puis isoniazide + rifampicine les 4 mois suivants ;
- médicaments administrés en une seule prise quotidienne à jeun ;
- nécessité d'une surveillance biologique rapprochée notamment hépatique et rénale.

La place de l'éthambutol est de plus en plus discutée et certains préconisent de ne le prescrire qu'en cas de suspicion de souche de BK résistante. Dans ce cas, le schéma repose sur une trithérapie pendant 2 mois puis INH+RMP les 4 mois suivants.
La durée du traitement peut être prolongée à 9 mois, voire 12 ou 18 mois.
La cause principale de l'apparition de la tuberculose multirésistante est la mauvaise observance du traitement.

Pour en savoir plus

- Synthèse et recommandations des groupes de travail du Conseil supérieur d'hygiène publique de France (1995-1996). La tuberculose : traitement et prévention. *BEH* 1997.
- Underner M., Meurice J.-C. Tuberculose pulmonaire et primo-infection tuberculeuse : épidémiologie, diagnostic, évolution, traitement, prévention. *Rev Prat* 1999 ; 49 : 867-75.
- Treatment of tuberculosis : a well-standardised protocol. *Prescrire Int* 2000 ; 9 (48) : 124-5.
- Jouveshomme S., Dautzenberg B. Les nouveaux antituberculeux. *Med Hyg* 1997 ; 55 : 764-6.
- Gonzales J., Dautzenberg B. Incidents et accidents du traitement antituberculeux. L'hépatite est l'effet secondaire le plus fréquent et le plus grave. *Rev Prat* 1996 ; 343 : 11-5.
- Wendel K.-A., Sterling T.-R. Tuberculose et VIH. *AIDS Clin Care* 2002 ; 14 (2).
- E. Pilly. *Maladies infectieuses et tropicales*. Associations professeurs de pathologie infectieuse et tropicale (APPIT), 20e édition.
- Sites Internet :
  - Données épidémiologiques mondiales : www.who.int (données de l'OMS).
  - Avis et rapport du conseil supérieur d'hygiène publique en France : prévention et prise en charge de la tuberculose : www.sante.gouv.fr/htm/dossier/tuberculose

Les aminosides utilisés par voie parentérale

L. VALLET, M.-H. FIEVET, R. FARINOTTI
Pharmacie, GH Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris.

Depuis la découverte de la streptomycine en 1944, plusieurs dérivés de la famille des aminosides ont été mis sur le marché.
Les aminosides ou aminoglycosides les plus récents (gentamicine, nétilmicine, amikacine, tobramycine) ont un spectre antimicrobien large et sont prescrits en milieu hospitalier pour les infections bactériennes sévères.

I. Structure chimique et classification

Les aminosides sont composés de sucres aminés reliés à un hexose central (aminocyclitol) par une liaison glycosidique. On distingue deux grands groupes :

A. Groupe de la streptidine (hexose non-aminé)

Avec la streptomycine et ses dérivés, ce groupe associe une molécule de streptidine à un pentose (streptose) et une glucosamine.

B. Groupe des dérivés de la 2-desoxystreptamine (hexose diaminé)

Ces dérivés peuvent être substitués soit en 4,5 soit en 4,6.

- Sous-groupe de la *desoxystreptamine substituée en 4 et 5* : la néomycine, la paromomycine (*fig. 1*).
  Le chef de file est la néomycine qui n'est plus utilisée par voie parentérale.

Figure 1. Desoxystreptamine

- Sous-groupe de la *desoxystreptamine substituée en 4 et 6* : la kanamycine, la gentamicine, la nétilmicine, la tobramycine, l'amikacine, la sisomicine et l'isepamicine, ces deux dernières ne sont plus commercialisées.
  Le chef de file est la kanamycine.

Note : la spectinomycine est rattachée au groupe des aminosides par sa structure apparentée à la streptomycine.

II. Origine

A. Extraction

Principalement produits par les actinomycètes dont les *Streptomyces* (streptomycine, tobramycine et kanamycine) et *Micromonospora* (gentamicine, néomycine).

B. Néphrotoxicité

C'est une tubulopathie résultant de la fixation de l'aminoside sur les cellules de la bordure en brosse et de son accumulation dans les lysosomes. Celle-ci entraîne une libération d'enzymes qui détruisent les cellules tubulaires.
La néphrotoxicité se traduit par une protéinurie, une hématurie, une augmentation de l'urémie et de la créatininémie. Les aminosides les plus néphrotoxiques, donc exclus de l'emploi par voie parentérale, sont la néomycine, la framycétine et la paromomycine. La toxicité rénale peut être favorisée par divers facteurs comme l'âge, la dose administrée, la durée de traitement, l'insuffisance rénale préexistante et l'association à des médicaments néphrotoxiques (vancomycine, amphotéricine B…)
La néphrotoxicité est essentiellement liée à la concentration plasmatique résiduelle. Cette atteinte est réversible lors de l'arrêt du traitement.

C. Autres effets toxiques

- Effet curarisant par blocage neuromusculaire lors d'une injection trop rapide par compétition avec le calcium de la plaque motrice.
- Réactions allergiques exceptionnelles (dermites de contact, eczéma…).

IX. Indications

Les indications extrahospitalières des aminosides injectables sont devenues très rares. Actuellement, ils sont principalement utilisés pour le traitement des infections hospitalières sévères, le plus souvent lorsque les germes responsables sont des bacilles à Gram négatif (BGN) : les entérobactéries et le bacille pyocyanique.
La marge thérapeutique étroite limite les posologies élevées aussi, ils sont utlisés dans la majorité des cas en association, notamment avec les βlactamines.
Dans la plupart des situations, un traitement de courte durée inférieur à 7 jours est recommandé, cela permet d'éviter et de limiter la toxicité cochléaire.
Une prolongation du traitement est justifiée :
- pour les infections sévères à entérocoques ;
- lorsqu'un risque de sélection de mutants résistants est élevé, par exemple en cas d'infections nosocomiales à BGN avec un inoculum important dans un foyer profond.

Remarque : outre la voie parentérale, les voies d'administration des aminosides et formes galéniques adaptées sont nombreuses :
- gélules pour agir localement dans le tube digestif car ils ne sont pas absorbés ;
- collyres pour voie intraocculaire ;
- solutions pour inhalation pour le traitement des infections pulmonaires chroniques des patients atteints de mucoviscidose (Tobi®) ;
- ciments osseux pour les interventions en chirurgie orthopédique ;
- ampoules injectables pour la voie intrarachidienne.

Ces voies sont utilisées pour des traitements curatifs (ou prophylactiques) locaux sachant que les autorités sanitaires tentent de limiter l'utilisation des antibiotiques par voie locale afin d'éviter la sélection de germes résistants.

Pénicillines

S. FARHANG-ASNAFI, C. DIVINÉ
Pharmacie, hôpital A. Chenevier, Créteil.
O. CONORT, Pharmacie, hôpital Cochin, Paris.
D. RICHARD, Hôpital Henri Laborit, Poitiers (actualisation et adaptation).

Depuis la découverte de la benzylpénicilline en 1928 par Fleming et son utilisation en thérapeutique à partir de 1942, la famille des pénicillines n'a cessé de croître. Les améliorations ont été d'ordre pharmacocinétique et bactériologique avec un élargissement du spectre d'activité. Les progrès dans la connaissance des mécanismes de résistance bactérienne ont, en particulier, conduit à associer certaines pénicillines à un inhibiteur des bêtalactamases. Trois de ces molécules sont actuellement commercialisées (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam).
Au sein de la famille des pénicillines se côtoient donc des anti-infectieux largement rencontrés en prescription de ville et des médicaments réservés à l'usage hospitalier avec des indications strictement limitées.
Les pénicillines inscrites à la Pharmacopée sont les suivantes :
- *Pharmacopée 9e édition : benzylpénicilline sodique, benzylpénicilline potassique, phénoxyméthylpénicilline (sous forme acide), benzathine benzylpénicilline ;*
- *Pharmacopée 10e édition : benzathine benzylpénicilline potassique et sodique, phénoxyméthylpénicilline, benzylpénicilline procaïne, amoxicilline trihydratée, ampicilline trihydratée et anhydre.*

I. Classification des pénicillines

- Pénicillines des groupes G et M : *tableau 1* ;
- Pénicillines du groupe A ou aminopénicillines : *tableau 2* ;
- Amidinopénicillines : *tableau 2* ;
- Carboxypénicillines : *tableau 2* ;
- Uréidopénicillines : *tableau 2* ;
- Pénicillines associées à un inhibiteur de bêtalactamases : *tableau 3*.

Tableau 1. Pénicillines des groupe G et M

Pénicillines du groupe G

	DCI	Spécialité	Voie	Forme galénique
Pénicilline G	Benzylpénicilline sodique	Pénicilline G®	Injectable IM et IV	Flacon 1 MUI
Pénicilline V	Phénoxyméthylpénicilline	Oracilline®	Orale	Cp 1 MUI Sus buv.
Pénicilline semi- retard	Bénéthaminepénicilline + benzylpénicilline sodique	Biclinocilline®	Injectable IM stricte	1 MUI
Pénicilline retard	Benzathine benzylpénicilline	Extencilline®	Injectable IM stricte	0,6-1,2-2,4 MUI

Pénicillines du groupe M

	DCI	Spécialité	Voie	Forme galénique
Pénicilline M	Oxacilline	Bristopen®	Orale	Gélules 500 mg Sirop 250 mg/mesure
			Injectable IM et IV	Flacon 1 g
	Cloxacilline	Orbenine®	Orale	Gélules 500 mg
			Injectable	Flacon 1 g IM Flacon 1 g IV (hôpital)

- *pénicillines résistantes à la pénicillinase staphylococcique* (même spectre que la pénicilline G, élargi aux souches de staphylocoques producteurs de pénicillinase) : méticilline, isoxazolylpénicillines (oxacilline, cloxacilline).
  Certaines souches de staphylocoques leur sont résistantes : souches méti-R ; elles émergent surtout en milieu hospitalier avec un taux de résistance compris entre 40 et 50 % ;

Méticilline

Oxacilline

Cloxacilline

- *pénicillines dont le spectre est élargi à certains bacilles Gram* – (entérobactéries, *Bordetella*, *Brucella*, vibrion cholérique), *sensibles aux bêtalactamases* : ampicilline, pro-ampicillines qui redonnent l'ampicilline par hydrolyse dans l'organisme (pivampicilline, bacampicilline) et analogue de l'ampicilline (amoxicilline) ;

Ampicilline

Amoxicilline

- *pénicillines à spectre élargi* (entérobactéries multirésistantes, *Pseudomonas aeruginosa) et sensibles aux bêtalactamases*. Ce groupe comprend :
  - *les carboxypénicillines* : ticarcilline,
  - *les uréidopénicillines* : mezlocilline, pipéracilline ;

Par rapport à ce schéma général, on peut noter :
- une meilleure diffusion dans les méninges et les tissus broncho-pulmonaires de l'amoxicilline par rapport à l'ampicilline ;
- une très bonne diffusion des carboxy et uréidopénicillines dans l'os et les méninges. Le taux de liaison aux protéines plasmatiques est modéré (≈ 50 % pour la pénicilline G) ou faible (≈ 20 %) pour les autres pénicillines, à l'exception des pénicillines du groupe M (≈ 90 %).

La pharmacocinétique de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique est superposable, mais l'acide clavulanique ne diffuse pas dans le LCR. Cette association n'est donc pas indiquée dans le traitement des méningites.

C. Métabolisme – Excrétion

La demi-vie d'élimination est courte, d'où la nécessité de réaliser des injections répétées. Par exemple. : pénicilline G : t 1/2 = 30 minutes ; carboxy et uréidopénicillines : t 1/2 = 1 heure.
L'élimination se fait essentiellement par voie rénale. La métabolisation étant faible (entre 20 et 30 %), elle se fait majoritairement sous une forme inchangée.
L'élimination rénale est réalisée à 10 % par filtration glomérulaire et à 90 % par sécrétion tubulaire à l'aide de transporteurs communs à certains acides organiques.
Les carboxy et uréidopénicillines présentent à la fois une élimination urinaire rapide sous forme active permettant le traitement d'infections urinaires, et une élimination biliaire suffisante pour permettre une thérapeutique adaptée à une infection locale.
L'acide clavulanique et le tazobactam sont éliminés par voie urinaire, et en forte proportion sous forme inchangée.
Il sera nécessaire d'adapter les doses en Claventin® et en Tazocilline® en cas d'insuffisance rénale.

V. Thérapeutique

A. Indications

1. Antibioprophylaxie

La prévention anti-infectieuse réalisée au moment de l'induction anesthésique peut être assurée par les pénicillines, seules ou en association, en fonction de l'écologie bactérienne présente au site opératoire :
- pénicilline M en chirurgie orthopédique et neurochirurgie ;
- pénicilline A + inhibiteur de bêtalactamases en traumatologie ;
- aminopénicilline associée à l'inhibiteur de bêtalactamases, ou amoxicilline associée à un aminoside en chirurgie digestive, gynécologique et urologique ;
- amoxicilline en soins dentaires pour la prophylaxie de l'endocardite infectieuse.

2. Traitement curatif

a) Pénicillines G

Ses indications sont nombreuses, parmi celles-ci figurent :

- les septicémies et endocardites à streptocoques et entérocoques sensibles à la pénicilline, avec association possible à un aminoside ;
- les septicémies et méningites à *Listeria monocytogenes* ;
- les infections à streptocoques : angines, infections cutanées, RAA… ;
- les infections localisées ou généralisées à anaérobies sensibles (gangrène gazeuse, angine de Vincent, tétanos…) ;
- la syphilis ;
- la diphtérie ;
- la leptospirose.

b) Pénicillines du groupe M

Elles sont utilisées dans le traitement des infections à staphylocoques méti-S.

c) Pénicillines A

- Infections des voies respiratoires supérieures et inférieures (bien que l'on observe des résistances acquises supérieures à 15 % pour *Haemophilus influenzae* et à 60 % pour *Branhamella catarrhalis*) ;
- Infections urinaires à bacilles gram – ;
- Listériose, pasteurellose, fièvre typhoïde, maladie de Lyme ;
- *Purpura fulminans*, pour la forme injectable ;
- L'amoxicilline est indiquée :
  - dans la prophylaxie des endocardites bactériennes et dans le traitement de la maladie de Lyme,
  - dans l'éradication de l'*Helicobacter pylori* en cas de maladie ulcéreuse gastro-duodénale. Le schéma thérapeutique préconisé associe l'amoxicilline 1 g matin et soir, la clarithromycine à raison de 500 mg deux fois par jour et un antisécrétoire inhibiteur de la pompe à protons (IPP). La durée optimale de cette trithérapie est de 7 jours. L'efficacité du traitement dépend du respect de ce schéma posologique ;
- la spécialité Augmentin® 500 mg/125 mg initialement commercialisée a été remplacée par Augmentin® 500 mg/62,5 mg. Le rapport amoxicilline/acide clavulanique est de 8/1 au lieu de 4/1. La posologie recommandée varie de 2 à 3 g par jour, à raison d'une prise unitaire de 1 g. Ce rapport 8/1 assure un apport important en amoxicilline tout en limitant la dose d'acide clavulanique administrée, la dose d'acide clavulanique à ne pas dépasser étant de 1 200 mg. Cette forme présente un intérêt dans les infections à pneumocoques avec une sensibilité réduite, tout en limitant les troubles digestifs.

d) Aminopénicilline associée à un inhibiteur des bêtalactamases

Cette association permet à l'aminopénicilline d'être active sur des bactéries productrices de bêtalactamases (*Haemophilus inflenzae, Branhamella catarrhalis*), en particulier dans les infections respiratoires et les otites de l'enfant.

e) Carboxy et uréidopénicillines

Seules ou associées, ce ne sont pas des antibiotiques de première intention. Il faut les réserver aux infections sévères à germes reconnus sensibles, *Pseudomonas aeruginosa* ou Gram – résistants à l'ampicilline. Dans ce cas, elles sont utilisées en association et notamment aux aminosides.
L'association pipéracilline-tazobactam est à réserver aux infections sévères de réanimation ou chez des patients fragilisés avec infections intra-abdominales, respiratoires, urinaires ou de la peau et des tissus mous, au vu des résultats de l'antibiogramme.

B. Effets secondaires

Les pénicillines restent des antibiotiques peu toxiques. Seule l'allergie, croisée avec les céphalosporines, est un problème majeur.

1. Accidents allergiques

- À la bêtalactamine :
  Les réactions peuvent être soit immédiates (rash, prurit, œdème de Quincke), soit retardées (rash) parfois au 8 ou au 10e jour. La possibilité d'observer un choc anaphylactique chez un malade ayant déjà présenté un incident de type allergique à la première administration doit inciter à l'interrogatoire ou aux tests cutanés en cas de doute.
  Quelques cas de toxicité hépatique ont été répertoriés : augmentation des transaminases hépatiques et/ou des phosphatases alcalines pouvant se compliquer d'une cholestase ou d'une hépatite.
- À la procaïne pour les formes à libération prolongée.

2. Troubles neurologiques

L'injection intrathécale, l'utilisation de fortes doses de pénicilline par voie intraveineuse ou la présence d'une insuffisance rénale peuvent être à l'origine de crises convulsives.

3. Effets secondaires spécifiques à certains produits

- Les dérivés de la pénicilline A (ampicilline, amoxicilline, amoxicilline + acide clavulanique) peuvent donner des rashs cutanés en cas de mononucléose infectieuse ou de traitement à l'allopurinol.
- Les pénicillines A, les carboxy et uréidopénicillines ont exceptionnellement entraîné des colites à fausses membranes.
- Hémorragies à la suite de l'administration de doses élevées de carboxy et uréidopénicillines.
- Des tubulopathies intersticielles aiguës sont décrites avec la méticilline.
- Mauvaise tolérance digestive des formes pédiatriques orales, notamment avec l'amoxicilline associée à un inhibiteur de bêtalactamases. La prise du médicament trois fois par jour au cours du repas peut prévenir ces troubles.

4. Troubles hématologiques réversibles

Anémie hémolytique, éosinophilie, thrombocytopénie, neutropénie, allongement du temps de saignement, augmentation de la prothrombine.

5. Divers

- Les pénicillines injectables notamment à forte dose peuvent être à l'origine de douleurs à l'injection (33 %) et de thrombophlébites (10 %).
- Hyperuricémie.

C. Contre-indications et précautions d'emploi

- Allergie aux bêtalactamines.
- Ne jamais injecter par voie IV les formes à libération prolongée.
- L'oxacilline et la cloxacilline sont contre-indiquées chez le nouveau-né et chez la femme enceinte (risque d'ictère nucléaire).
- La mononucléose infectieuse (MNI) est une contre-indication pour les pénicillines A.
- L'association d'une aminopénicilline est contre-indiquée avec les hypo-uricémiants de type allopurinol.
- Lors d'insuffisance rénale sévère, les posologies seront adaptées selon la clairance de la créatinine.
- Augmenter progressivement les doses dans le traitement de la syphilis pour éviter une réaction d'Herxheimer (choc endotoxinique lié à une destruction brutale des tréponèmes).
- Tenir compte de l'apport sodique et/ou potassique des différentes préparations.
- L'association au méthotrexate est fortement déconseillée : augmentation de la toxicité hématologique du méthotrexate par inhibition de la sécrétion tubulaire rénale par les pénicillines.

D. Interactions

1. Physico-chimiques

Ne pas mélanger dans la même seringue d'autres médicaments (insuline, héparine) ou d'autres antibiotiques.
Il y a incompatibilité avec les solutés de perfusion dont le pH est inférieur à 5,5 ou supérieur à 8.
Ne pas mélanger les bêtalactamines aux aminosides.

2. Médicamenteuses

Il existe une synergie avec l'acide fusidique mais surtout avec les aminosides par un mécanisme de stimulation de la phagocytose et par la lyse bactérienne.
L'association pénicilline M et fosfomycine est synergique.
L'association à des médicaments bactériostatiques doit être évitée (rifampicine, chloramphénicol, tétracyclines, sulfamides).
L'association de tazocilline et de céfoxitine doit être évitée (antagonisme contre les pyocyaniques).

Céphalosporines

O. CONORT V. LECANTE
Pharmacie, hôpital Cochin, Paris.
C. DIVINÉ, Pharmacie, hôpital A. Chenevier, Créteil.
D. RICHARD, Hôpital Henri Laborit, Poitiers (actualisation 2007).

I. Classification des céphalosporines

II. Structure chimique

III. Relation structure-activité

- **A.** Chaîne latérale R1
- **B.** Chaîne R_2
- **C.** Chaîne R_3

IV. Mécanisme d'action

V. Résistance

VI. Spectre

VII. Pharmacocinétique

- **A.** Céphalosporines de première génération administrables par voie orale
- **B.** Céphalosporines de deuxième et troisième générations administrables par voie orale
- **C.** Céphalosporines administrées par voie parentérale (IM, IV)

VIII. Indications thérapeutiques

- **A.** Céphalosporines de première génération
- **B.** Céphalosporines de deuxième génération
- **C.** Céphalosporines de troisième génération

IX. Effets secondaires

- **A.** Effets secondaires communs à toutes les céphalosporines
- **B.** Effets secondaires liés à la présence du groupement méthylthiotétrazole
- **C.** Troubles digestifs

Tableau 2. Spectre antibactérien : Bacilles à Gram négatifs

		Esp. habituellement sensibles	Esp. modérément sensibles	Esp. inconstamment sensibles	Esp. résistantes
Céphalosporines 1re génération					
1er groupe	Céfalexine Céfadrine Céfadroxil		*Haemophilus influenzae* *Salmonella* *Shigella* *Citrobacter diversus* *Proteus mirabilis*	*E. coli* *Klebsiella* *Prevotella*	*Enterobacter* *Serratia* *Citrobacter* *Proteus vulgaris* *Pseudomonas* *Acinetobacter* *Yersinia* *Providencia*
2e groupe	Céfaclor	*Haemophilus* influenzae	id.		id.
3e groupe	Céfapirine Céfazoline	*E. Coli* *Salmonella* *Shigella* *Proteus mirabilis* *Haemophilus influenzae*		*Klebsiella*	id.
Céphalosporines 2e génération					
1er groupe	Céfuroxime	*Haemophilus influenzae*	*Shigella* *Salmonella* *Citrobacter diversus* *Proteus mirabilis*	*Klebsiella* *E. coli* *Prevotella*	*Providencia* *Pseudomonas* *Acinetobacter* *Serratia* *Proteus vulgaris* *Enterobacter* *Citrobacter*
2e groupe	Céfamandole (retiré du commerce)	id. 1er groupe + *E. coli* *Proteus mirabilis*		*Klebsiella* *Citrobacter* *Enterobacter* *Providencia* *Proteus morgani*	*Pseudomonas* *Acinetobacter* *Serratia* *Proteus vulgaris*

…/…

		Esp. habituellement sensibles	Esp. modérément sensibles	Esp. inconstamment sensibles	Esp. résistantes
3e groupe	Céfoxitine (retiré du commerce)	id. 2e groupe + *Shigella* *Proteus vulgaris* *Salmonella* *Klebsiella* *Providencia*		*Acinetobacter* *Serratia marcescens*	*Pseudomonas* *Enterobacter* *Citrobacter*
Céphalosporines 3e génération					
1er groupe	Céfotiam Cefpodoxime Céfixime	*Haemophilus influenzae* *E. coli* *Salmonella* *Shigella* *Citrobacter diversus* *Proteus mirabilis* *Providencia*		*Klebsiella* *Proteus vulgaris* *Prevotella*	*Enterobacter* *Serratia* *Citrobacter*
2e groupe	Céfotaxime Ceftriaxone	id. 1er groupe + *Proteus vulgaris* *Klebsiella oxytoca* *Klebsiella pneumoniae (latamoxef)*		*Klebsiella pneumoniae* *Serratia* *Enterobacter* *Citrobacter* *Pseudomonas (céfopérazone)*	*Pseudomonas* *Acinetobacter*
3e groupe	Céfotétan (retiré du commerce)				
4e groupe	Ceftazidime	id. 2e groupe + *Serratia* *Pseudomonas*		*Enterobacter* *Citrobacter* *Klebsiella* *Acinetobacter*	
5e groupe	Cefpirome Céfépime	id. 2e groupe + *Serratia* *Citrobacter* *Enterobacter*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Klebsiella* *Acinetobacter*	*Pseudomonas cepacia*
6e groupe	Cefsulodine			Pseudomonas aeruginosa	

Les staphylocoques ne sont pas sensibles à la céfixime (CMI 50 de 8 à 16). Elle possède le même spectre, cependant, que les céphalosporines de 3[e] génération sur les bacilles Gram négatifs. Le cefpodoxime proxétil a le même profil antibactérien que la céfixime à ceci près qu'il apparaît supérieur vis-à-vis des streptocoques et staphylocoques in vitro, ce qui constituerait un avantage dans les infections ORL.
Les céphalosporines n'ont aucune activité sur les espèces bactériennes suivantes : Entérocoques, *Listeria monocytogenes, Legionella, Mycoplasma pneumoniae, Ureaplasma, Chlamydia,* Rickettsies.

VII. Pharmacocinétique

A. Céphalosporines de première génération administrables par voie orale

Résorption : entre 80 et 90 % mais elle est influencée par les aliments.
Demi-vie d'élimination : entre 0,6 et 0,9 heure.
Liaison protéique faible : entre 10 et 30 %.
Excrétion urinaire : entre 50 et 85 %.

B. Céphalosporines de deuxième et troisième générations administrables par voie orale

Résorption : entre 40 et 50 %, améliorée par les aliments pour le céfuroxime axétil et le cefpodoxime proxétil.
Demi-vie d'élimination : entre 1,3 et 3,3 heures (la demi-vie d'élimination de 3,3 heures de la céfixime est la plus longue des céphalosporines orales actuellement commercialisées).
Liaison protéique : entre 30 et 60 %.
Excrétion urinaire céfotiam hexétil, céfuroxime axétil et cefpodoxime proxétil : 80 % ; céfixime : 20 % ; l'élimination est principalement biliaire.

C. Céphalosporines administrées par voie parentérale (IM, IV)

Demi-vie d'élimination : en moyenne, elle est d'environ deux heures ce qui se traduit par une administration trois à quatre fois par jour. Cet intervalle est ramené à deux injections par jour pour quelques antibiotiques à demi-vie plus longue (céfopérazone…) et à deux voire une seule injection quotidienne pour la ceftriaxone, dont la demi-vie est de huit heures.
Liaison protéique : très variable d'une molécule à l'autre, entre 10 et 90 %.
Diffusion tissulaire : les céphalosporines diffusent de façon ubiquitaire, atteignant la plupart des tissus et liquides biologiques de l'organisme (os, prostate, ascite, poumon, synovial…). Seules les « troisième génération » sont indiquées dans le traitement des méningites, leurs CMI très basses compensant leur faible passage méningé

indésirables que des troubles digestifs du type diarrhées, nausées, vomissements, douleurs abdominales et gastralgies.
Diarrhées : (ceftriaxone). Cet effet est lié à leur fort pourcentage d'élimination biliaire.
Colites pseudomembraneuses : quelques cas ont été rapportés avec céfotaxime, céfixime, cefpirome et céfépime.

X. Contre-indications

- L'allergie aux céphalosporines (et/ou à la lidocaïne pour la voie intramusculaire) contre-indique l'utilisation de ces antibiotiques.
- Enfant de moins de 30 mois pour les préparations contenant de la lidocaïne.
- Les céphalosporines de 1re et de 2e génération sont contre-indiquées dans les méningites en raison d'une diffusion insuffisante.

XI. Précautions d'emploi

- Chez l'insuffisant rénal, il est nécessaire d'adapter la posologie en fonction de la clairance de la créatinine.
- Tenir compte de l'apport sodique (céphalosporines utilisées par voie parentérale sous forme de sels) dans certaines indications.
- Éviter tout traitement avec ces antibiotiques pendant la période d'allaitement ou suspendre l'allaitement car les céphalosporines sont excrétées dans le lait.

XII. Interactions médicamenteuses

A. Associations déconseillées

Alcool (pour le céfamandole, la céfopérazone) : effet Antabuse.

B. Précaution d'emploi

Céfalotine + aminosides : augmentation de la néphrotoxicité des aminosides.

C. Association synergique

- Aminosides ;
- Autres bêtalactamines.

Céfuroxime

Céfuroxime axétil

Céphalosporines de 2[e] génération

Céfotiam

Ceftazidime

Céfotaxime

Ceftriaxone

Céfixime

Cefsulodine

Cefépime

Céfpodoxime-proxétil

Cefpirome

Céfotiam-hexétil

Céphalosporines de 3[e] génération

XV. Les thiénamycines (carbapénèmes)

Il existe trois représentants de cette classe d'antibiotiques : l'imipénème, le méropénème et l'ertapénème.
- L'imipénème est commercialisé associé à la cilastatine, dans un rapport de dose 1/1, sous le nom de Tienam® (IV, IM).
- Le méropénème, est commercialisé sous le nom de Méronem®.
- L'ertapénème est quant à lui commercialisé sous le nom de Invanz (perfusion IV)

A. Relation structure-activité

Cette classe est caractérisée par le noyau « carbapénème » où l'atome de soufre du cycle thiazolidine est remplacé par un atome de carbone. L'étendue du spectre antibactérien est liée à la présence de ce noyau carbapénème.
La chaîne latérale présente sur le cycle bêtalactame explique la grande stabilité en présence de bêtalactamases.
La chaîne latérale thioalcoyle renforce l'activité vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*.

B. Bactériologie

1. Mécanisme d'action

Comme toutes les bêtalactamines, les carbapénèmes inhibent la synthèse de la paroi bactérienne par blocage de la transpeptidase.
Leur action est bactéricide et ils entraînent la lyse de la bactérie.
Ils sont très résistants aux bêtalactamases.
La cilastatine ne présente aucune activité antibiotique.

2. Spectre

Leur spectre est le plus étendu de toutes les bêtalactamines :
- espèces habituellement sensibles :
  - germes aérobies : tous sauf *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, staphylocoque méti-R, *Enterococcus faecium*,
  - germes anaérobies à Gram positifs et négatifs : tous ;
- espèces inconstamment sensibles : *Pseudomonas æruginosa*, *Enterococcus faecium* ;
- espèces résistantes : staphylocoque méti-R, *Xanthomonas maltophilia*, *Pseudomonas cepacia*, *Chlamydia*, mycoplasmes, mycobactéries.

C. Pharmacocinétique

Les carbapénèmes ne sont pas résorbés par voie orale ; leur administration se fait par voie parentérale. Ils diffusent bien dans tous les tissus et liquides biologiques ; cependant, leur diffusion dans le LCR est variable. Ils passent la barrière placentaire et se retrouvent dans le lait maternel.

Ils sont éliminés par voie urinaire. L'imipénème est capté par la cellule du tubule rénal et métabolisé pour un fort pourcentage en produit inactif par la déhydropeptidase I, au niveau de la bordure en brosse.
Ce métabolisme est à l'origine d'une toxicité rénale et de faibles concentrations en produit actif. La cilastatine est associée à l'imipénème dans un rapport 1/1 ; la cilastatine est un inhibiteur spécifique et compétitif de la déhydropeptidase I.
Cette association permet d'augmenter l'élimination urinaire sous forme active. Le méropénème est stable à la déhydropeptidase humaine 1, il n'y a donc pas la nécessité d'adjoindre un inhibiteur type cilastatine ; il est éliminé sous forme inchangée (demi-vie de 1 heure). Idem pour l'ertapénème.
Pour l'imipénème, les différences pharmacocinétiques de la forme IM avec la forme IV sont dues à une résorption plus lente :

- une demi-vie plus longue : respectivement 2,5 heures et 1 heure ;
- une concentration plasmatique maximale plus basse : respectivement 11 mg/L et 41 mg/L.

D. Thérapeutique

1. Indications

a) Imipénème

- Voie IV

Ce sont les infections sévères d'origine hospitalière dues à des germes multirésistants à l'exclusion des méningites : septicémies, endocardites, infections respiratoires, abdominales, ostéoarticulaires, urinaires.

- Voie IM

Ce sont les infections urinaires peu graves de l'adulte.

b) Méropénème et ertapénème

Les indications sont limitées aux infections sévères, bactériémiques ou non, dues aux germes sensibles au méropénème : les infections respiratoires basses, les infections abdominales, les épisodes fébriles chez les patients neutropéniques.

2. Posologie

L'imipénème est sur la liste I et est réservé aux hôpitaux. Il est administré en perfusions IV lentes, à la dose de 1 à 2 g/j répartis en 3 ou 4 perfusions (jusqu'à 50 mg/kg/j sans dépasser 4 g/j) ; l'administration IM s'effectue toutes les 12 heures à la dose de 500 mg à 750 mg, ne jamais dépasser 1,5 g/j avec cette voie.
Le méropénème est sur la liste I et est réservé à l'usage hospitalier. Il est administré en injection IV directe en 5 minutes environ ou en perfusion IV courte de 15 à 30 minutes, à la dose comprise entre 500 et 1 000 mg toutes les 8 heures.
L'ertapénème est administré en IV à la dose de 1 g/j en une perfusion unique.

3. Effets indésirables

- Réactions allergiques (urticaire, œdème de Quincke, voire choc anaphylactique). Troubles digestifs (diarrhées, vomissements, quelques cas de colites pseudomembraneuses).

Les fluoroquinolones

C. HUSTACHE, M. ROUSTIT, C. TRIVIN, J. CALOP
Pôle pharmacie, CHU Grenoble.

E. Troubles psychiques, neurologiques et sensoriels
F. Troubles du rythme cardiaque
G. Troubles métaboliques
H. Troubles hématologiques
I. Troubles hépatiques
J. Troubles rénaux

IX. Contre-indications

X. Précautions d'emploi

XI. Interactions médicamenteuses

Figure 2. Dérivés 7-pipérazinyles

	R_1	R_5	X_8	R_3'	R_4'	R_5'
Ciprofloxacine	cC_3H_5	H	CH	H	H	H
Péfloxacine	C_2H_5	H	CH	H	CH_3	H
Norfloxacine	C_2H_5	H	CH	H	H	H
Énoxacine	C_2H_5	H	N	H	H	H
Loméfloxacine	C_2H_5	H	CF	H	H	CH_3
Gatifloxacine	cC_3H_5	H	$COCH_3$	CH_3	H	H

L'ofloxacine et son isomère lévogyre, la lévofloxacine, sont des dérivés tricycliques :

Figure 3. Ofloxacine et lévofloxacine

L'ofloxacine, la lévofloxacine et la péfloxacine sont les seuls dérivés à avoir un méthyl en para du pipérazinyl.
La loméfloxacine se caractérise par un groupement fluoré supplémentaire en C_8.
Des molécules plus récentes possèdent en C_7 un noyau bicyclique comme la moxifloxacine :

Figure 4. La moxifloxacine

IV. Pharmacologie

A. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des fluoroquinolones est complexe et n'est que partiellement élucidé. Il dépend initialement de la capacité des fluoroquinolones à pénétrer dans la cellule bactérienne et à s'y concentrer. En fonction de leurs caractéristiques structurales et physico-chimiques, les molécules traverseront plus ou moins facilement la paroi des bacilles à Gram négatif ou le peptidoglycane des bactéries à Gram positif, ainsi que la membrane cytoplasmique de tous ces micro-organismes. Ce premier obstacle franchi, les fluoroquinolones subissent un mécanisme actif d'efflux qui tend à réduire leur concentration intrabactérienne, et qui peut être surexprimé par certaines souches, contribuant ainsi à un phénomène de résistance. Dans les cellules bactériennes, l'ADN chromosomique est très étroitement replié sur lui-même en une forme inactive « surenroulée ». Lorsque l'activité métabolique nécessite le recours à ce génome (réplication, transcription...), la partie d'ADN concernée est dépliée, puis recondensée par la suite. Ces changements de configuration topologique sont régis par un système de topoisomérases : topoisomérase I et topoisomérase II (ADN gyrase). Les fluoroquinolones qui interagissent avec les complexes ADN/ADN gyrase inhibent alors cette activité indispensable à la réplication et à la survie bactérienne. Certaines molécules (les plus récentes) interfèrent aussi avec la topoisomérase IV qui est également nécessaire au développement des bactéries. Ces phénomènes sont complétés par divers mécanismes moins bien définis mais qui participent largement à l'activité bactéricide : modifications de la structure du peptidoglycane, stress oxydant et production d'autolysines en réponse à l'agression de l'ADN.

B. Spectre antibactérien

1. Cocci Gram +

- *Staphylocoques méticilline S :* inconstamment sensible (IS) avec l'énoxacine et la loméfloxacine et sensible (S) avec les autres fluoroquinolones.
- *Staphylocoques méticilline R et entérocoques* : **résistants (R).**
- *Streptocoques* : les fluoroquinolones ont une activité modeste sur les streptocoques, à l'exception de la lévofloxacine et de la moxifloxacine (actives y compris sur le pneumocoque).

2. Cocci Gram –

Neisseria gonorrhoeae, *Neisseria meningitidis* et *Branhamella catarrhalis* : **S.**

3. Bacilles Gram +

Listeria monocytogenes et *Nocardia* : **R.**

4. Prostatites

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques de choix car elles sont actives sur les germes le plus souvent incriminés (bacilles Gram négatif, staphylocoques) et elles possèdent une excellente diffusion tissulaire. De plus, leur utilisation *per os* facilite les traitements ambulatoires prolongés.

- *Prostatites aiguës* : en fonction de la sévérité de l'infection, les fluoroquinolones sont utilisées seules ou en association à un aminoside pendant quelques jours. La durée de traitement moyenne est de 6 semaines ; la moxifloxacine n'est pas indiquée dans ce cadre ;
- *Prostatites chroniques :* Compte tenu du remaniement sclérofibreux du tissu prostatique, les fluoroquinolones sont particulièrement intéressantes en raison de leur forte diffusibilité. Un traitement de 12 semaines n'est pas toujours suffisant et peut être prolongé plusieurs mois si la tolérance le permet ; à ce titre, l'apparition d'arthromyalgies (en particulier chez des sujets jeunes et physiquement actifs) peut être à l'origine d'une interruption thérapeutique. Ce phénomène a été le plus souvent rencontré lors de l'utilisation de la péfloxacine si bien que d'autres molécules lui seront préférées : norfloxacine, énoxacine, ofloxacine, ciprofloxacine ou lévofloxacine.

5. Infections génitales

- *Urétrite gonococcique aiguë masculine* : « traitement minute » par la norfloxacine, la péfloxacine, l'ofloxacine, l'énoxacine ou la ciprofloxacine ;
- *Urétrite non gonococcique* : ofloxacine pendant 7 jours ;
- *Cervicite gonococcique ou non* : ofloxacine (traitement de 2e intention) ;
- *Infection gynécologique haute (salpingite)* : ofloxacine en association avec un antibiotique actif sur les streptocoques et les anaérobies.

6. Infections ostéo-articulaires

L'utilisation des fluoroquinolones *per os* permet d'effectuer le relais d'un traitement initialement débuté à l'hôpital. Par ailleurs, elle est justifiée par leur excellente diffusion tissulaire, y compris dans l'os. En début de traitement, les fluoroquinoroles sont généralement utilisées en association.

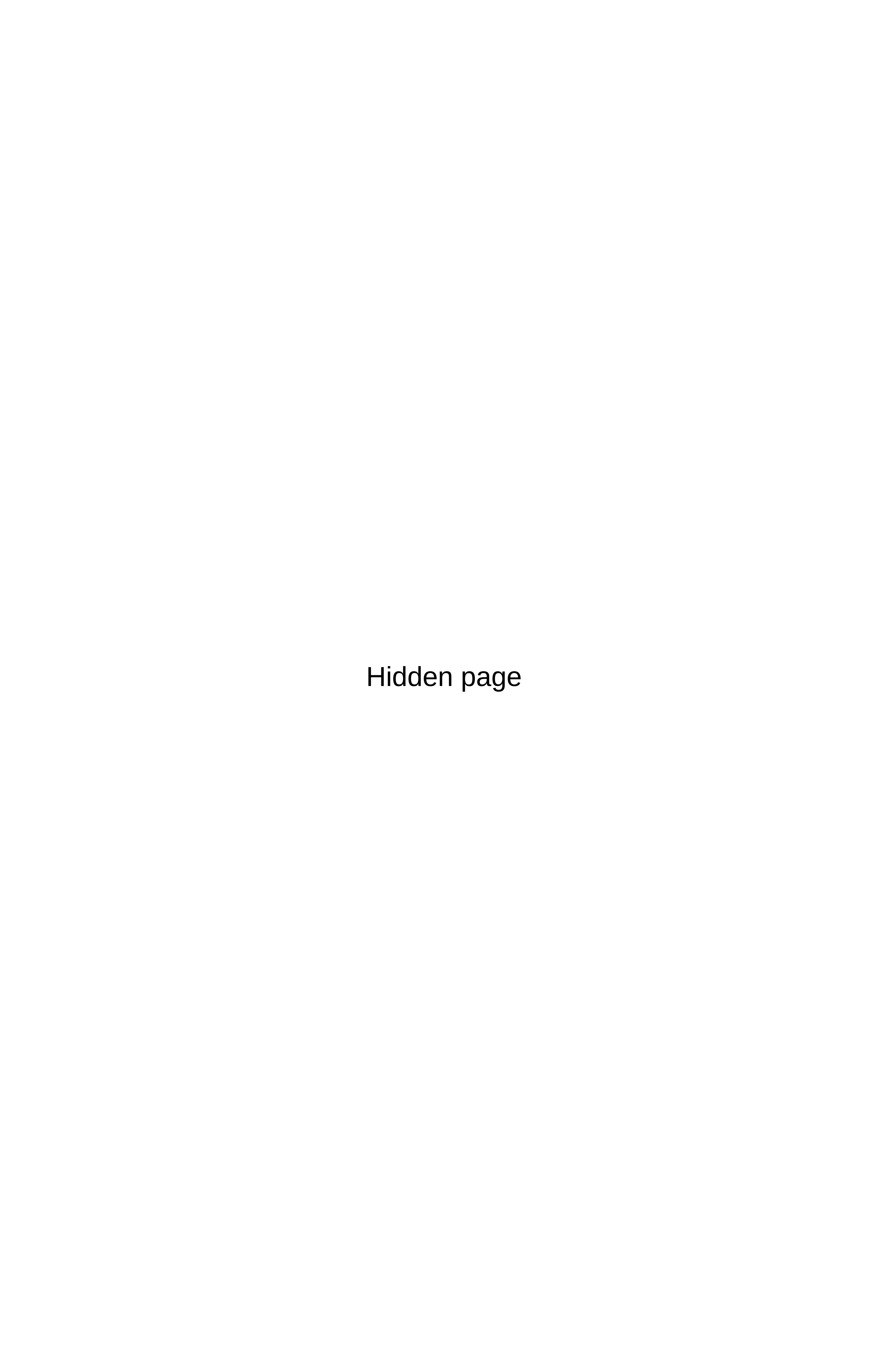
7. Diarrhées bactériennes à germes invasifs

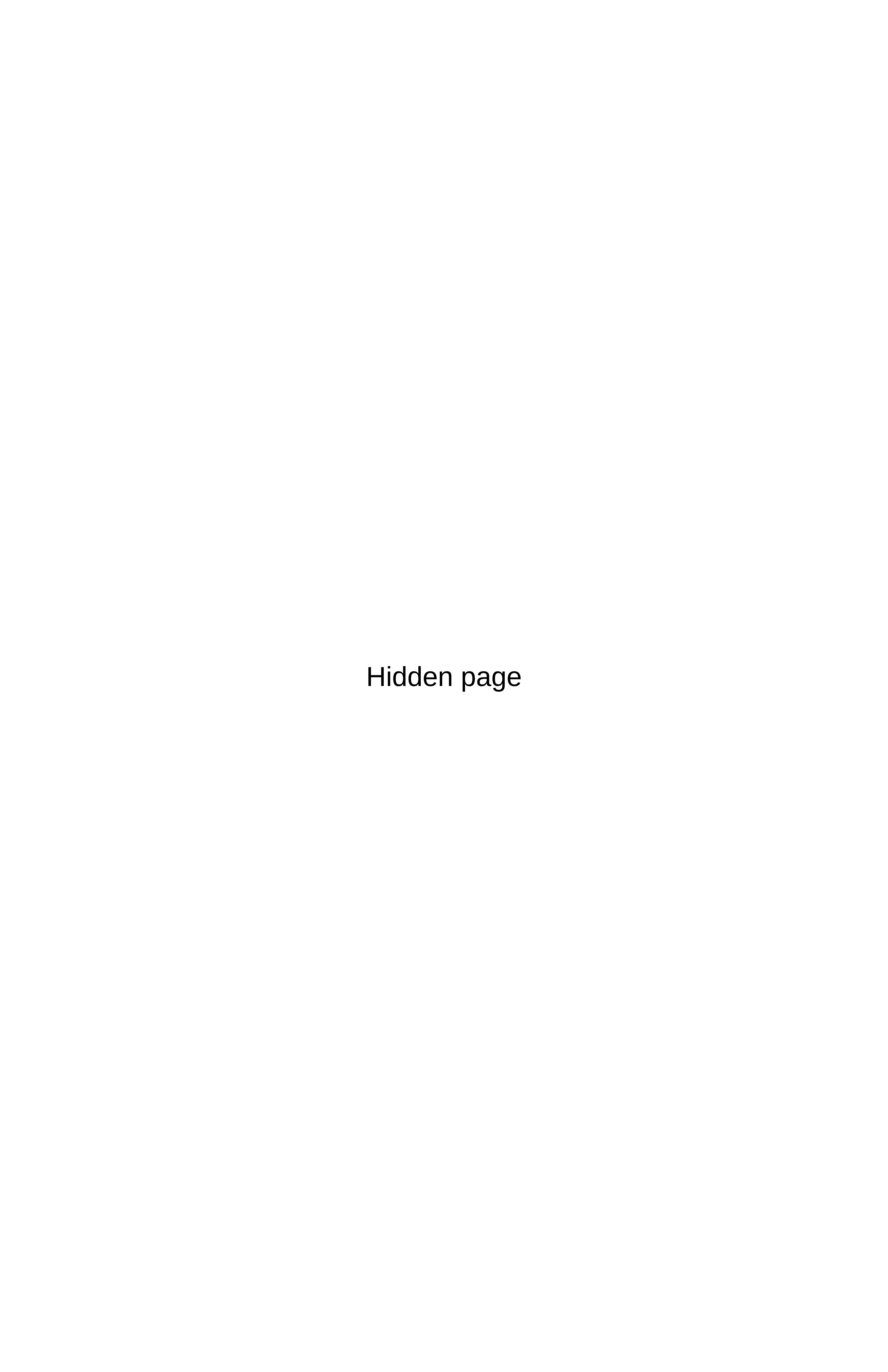
Les principaux germes sont notamment *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter* et *Escherichia coli*. La ciprofloxacine est la plus souvent indiquée ; elle pourra également être prescrite dans un but d'éradication en cas de portage chronique de salmonelles.

Note : chez les sujets immunodéprimés, les fluoroquinolones sont utilisées pour la décontamination du tube digestif en association avec la vancomycine (germes anaérobies épargnés).

8. Infections ORL

En pratique quotidienne chez l'enfant et l'adulte sans facteur de risque ni terrain particulier, il n'y a pas lieu d'utiliser les fluoroquinolones dans les infections de la


Hidden page


Hidden page

E. Troubles psychiques, neurologiques et sensoriels

Céphalées, vertiges, troubles du sommeil, asthénie, confusion, hallucinations, troubles sensoriels (vision, audition, goût et odorat), anxiété, agitation, nervosité, dépression, sensations ébrieuses, paresthésies, hypertension intracranienne (cirpofloxacine).
Quelques cas de crises convulsives ont été décrits et doivent inciter à la prudence chez les patients aux antécédents de convulsions ou présentant des facteurs prédisposants.
En raison d'une aggravation possible de leur maladie, des précautions doivent êtres prises chez les patients myasthéniques.

F. Troubles du rythme cardiaque

La norfloxacine, la lévofloxacine, la gatifloxacine et surtout la moxifloxacine peuvent entraîner des allongements de l'espace QT, allant dans de très rares cas jusqu'à des torsades de pointes. Cet effet indésirable serait un effet classe ; il est potentialisé par l'hypokaliémie ou des conditions proarythmogènes sévères.
La lévofloxacine et la moxifloxacine entraînent également des tachycardies.

G. Troubles métaboliques

La gatifloxacine peut être responsable d'hypo ou d'hyperglycémie, notamment chez le patient diabétique. Cela impose une surveillance accrue de la glycémie dans ce contexte, avec un arrêt de l'antibiotique si nécessaire.

H. Troubles hématologiques

Thrombopénies, leucopénies, hyperéosinophilies réversibles à l'arrêt du traitement et plus exceptionnellement anémies hémolytiques (ofloxacine, ciprofloxacine, lévofloxacine, péfloxacine, énoxacine) ou agranulocytose (lévofloxacine).

I. Troubles hépatiques

Augmentation des transaminases, de la bilirubine, des phosphatases alcalines et plus exceptionnellement, survenue d'hépatites.

J. Troubles rénaux

Augmentation de la créatininémie et plus rarement insuffisance rénale aiguë.
Il existe un risque de cristallurie avec la norfloxacine et la ciprofloxacine.

IX. Contre-indications

- Antécédent d'allergie à une fluoroquinolone ;
- Antécédent de tendinopathie sous fluoroquinolone ;
- Grossesse (CI relative avec ciprofloxacine, ofloxacine, lévofloxacine) ;
- Allaitement ;
- Enfants jusqu'à la fin de la période de croissance (CI relative avec la ciprofloxacine) ;
- Allongement congénital ou acquis de l'espace QT, hypokaliémie, bradycardie, insuffisance cardiaque avec baisse de la fraction d'éjection, antécédent de troubles du rythme, association aux médicaments allongeant l'espace QT : moxifloxacine et gatifloxacine ;
- Déficit en glucose 6 phosphate déshydrogénase (risque accru d'hémolyse aiguë) : ofloxacine, lévofloxacine, péfloxacine et énoxacine ;
- Épilepsie : ofloxacine, lévofloxacine et l'énoxacine ;
- Association à la théophylline : énoxacine ;
- Diabète : gatifloxacine.

X. Précautions d'emploi

Dans le cadre d'infections nosocomiales ou lors de traitements au long cours, il est nécessaire de suivre la sensibilité des souches en cours de traitement car il y a un risque de sélection de souches résistantes, notamment parmi les staphylocoques et les *Pseudomonas* ; en conséquence, pour ces deux germes, l'association à un autre antibiotique est justifiée.
En raison de la survenue possible de troubles neurologiques, il faut être prudent quant à l'utilisation des fluoroquinolones chez les personnes ayant besoin de toute leur vigilance (conducteurs d'engins, utilisateurs de machines...).
Un traitement par les fluoroquinolones peut inhiber la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* et être à l'origine de résultats faussement négatifs dans le cadre du diagnostic microbiologique de la tuberculose.

XI. Interactions médicamenteuses

En raison d'une diminution de l'absorption digestive des fluoroquinolones, des précautions d'emploi sont nécessaires avec :
- la didanosine (présence d'un antiacide dans la formulation), les sels de fer et de zinc par voie orale (chélation des fluoroquinolones) : prendre ces médicaments à distance des fluoroquinolones (au moins 2 heures, 6 heures pour la moxifloxacine) ;
- les topiques gastro-intestinaux : prendre ces composés à distance des fluoroquinolones (au moins 4 heures, 6 heures pour la moxifloxacine) ;
- le sucralfate : un délai de 2 heures minimum est préconisé entre son administration et celle de la ciprofloxacine, de la lévofloxacine, la gatifloxacine ou de la loméfloxacine, et de 6 heures pour la moxifloxacine ;

- l'association de la loméfloxacine à des sels de magnésium ou d'aluminium est déconseillée (diminution de la biodisponibilité de 50 % environ) ;
- en association avec la théophylline ou l'aminophylline, la ciprofloxacine, la péfloxacine et la norfloxacine nécessitent des précautions d'emploi (surveillance clinique et éventuellement dosage de la théophyllinémie), tandis que l'énoxacine est contre-indiquée. En effet, il y a un risque de surdosage en théophylline, lié à un phénomène d'inhibition enzymatique par compétition au niveau du site de fixation des bases xanthiques sur le cytochrome P-450 ;
- avec la ciprofloxacine, la norfloxacine, et par mesure de prudence avec la péfloxacine et la loméfloxacine, une surveillance renforcée (TP, INR) est recommandée en cas d'association à des anticoagulants oraux (risque hémorragique accru) ;
- la moxifloxacine est contre-indiquée en association aux médicaments arythmogènes ou modifiant l'intervalle QT. Elle expose en effet à des troubles du rythme potentiellement graves, pouvant aller jusqu'à des torsades de pointes ;
- en raison d'une diminution du métabolisme hépatique de la caféine, l'association à la ciprofloxacine ou à la norfloxacine est à prendre en compte, et sera déconseillée avec l'énoxacine ;
- le probénécide diminue l'excrétion urinaire de la lévofloxacine et de la norfloxacine, avec pour conséquence une augmentation possible de leurs concentrations sériques, en particulier chez l'insuffisant rénal. Un tel phénomène est également observé lors de l'association lévofloxacine-cimétidine ;
- l'utilisation concomitante de la norfloxacine ou de l'énoxacine avec le fenbufène est déconseillée car il y a un risque d'addition des effets indésirables (risque de convulsions).

L'essentiel de la question

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques inhibant la topoisomérase II (ADN gyrase).

Pharmacocinétique

- Elles ont une très bonne biodisponibilité (80 à 100 % sauf pour la norfloxacine). La voie injectable est donc utilisée uniquement lorsqu'on veut une action rapide ou que la voie orale est impossible ;
- Leur diffusion tissulaire et intracellulaire est excellente ;

Elles sont éliminées par voie rénale (+/– biliaire). En cas d'insuffisance rénale, une adaptation posologique est nécessaire pour toutes les fluoroquinolones sauf la moxifloxacine. En cas d'insuffisance hépatique, les posologies de la ciprofloxacine et de la péfloxacine sont à adapter.

Spectre

Les fluoroquinolones ont un spectre large, incluant :

- les staphylocoques ;
- les cocci Gram négatif ;
- les bacilles Gram négatif (sauf *Brucella, Acinetobacter*) ;

certaines bactéries intracellulaires.

L'émergence rapide de résistances pour certaines souches de *Staphylococcus aureus* et des entérobactéries doit inciter à une utilisation raisonnée des fluoroquinolones.

Macrolides

S. FARHANG-ASFANI, C. DIVINÉ
Pharmacie, hôpital Albert Chenevier, Créteil.
O. CONORT, Pharmacie, hôpital Cochin, Paris.
D. RICHARD, Hôpital Henri Laborit, Poitiers (actualisation 2007).

Les macrolides constituent une famille d'antibiotiques assez homogène sur le plan du spectre antibactérien. Depuis la découverte de la pikromycine en 1942 par Gardner, de nombreux macrolides ont été découverts. L'érythromycine utilisée depuis 1952 reste la molécule de référence.
Les nouveaux macrolides offrent une meilleure biodisponibilité, une plus grande tolérance, et semblent donner moins d'interactions médicamenteuses.
De demi-vie très longue, la nouvelle classe de macrolides (les azalides) permet de proposer des schémas thérapeutiques de courte durée d'environ 3 ou 4 jours ou en prise unique.
Bonne maniabilité, peu d'effets indésirables, spectre antibactérien adapté à l'écologie des infections ORL et broncho-pulmonaires et formes galéniques nombreuses expliquent leur large prescription en première intention.

Les macrolides inscrits à la Pharmacopée française sont les suivants :
- *spiramycine, 10e édition ;*
- *érythromycine base, 10e édition ;*
- *érythromycine éthylsuccinate, 10e édition ;*
- *érythromycine propionate, 9e édition ;*
- *érythromycine stéarate, 10e édition ;*
- *troléandomycine, 10e édition.*

Comme tout antibiotique, chaque présentation de macrolides est inscrite sur la liste I.

I. Relation structure activité

Les macrolides sont caractérisés par un cycle lactonique réuni à des oses, substitué par des hydroxyles, des groupements alkyles et une fonction basique (cétone pour les macrolides à 14 atomes de carbone, aldéhyde pour les macrolides à 16 atomes de carbone) (*fig. 1*).
Le *tableau 1* donne la classification des macrolides.

Tableau 1. Classification des macrolides

	Macrocycle	Fonction basique	Nombre de sucres	Positionnement des sucres	PA
Macrolides à 12 atomes	Méthymycine	Cétone	1	Sucre aminé	Aucun
Macrolides à 14 atomes	Érythromycine	Cétone	2	1 sucre aminé 1 sucre neutre	Érythromycine Clarithromycine Roxithromycine Dirithromycine
Macrolides à 15 atomes	Azithromycine	Cétone	2	1 sucre aminé 1 sucre neutre	Azithromycine
Macrolides à 16 atomes	Leucomycine	Aldéhyde	2	1 sucre aminé 1 sucre neutre	Josamycine Midécamycine
			3	2 sucres aminés 1 sucre neutre	Spiramycine

CNIMH, 1991

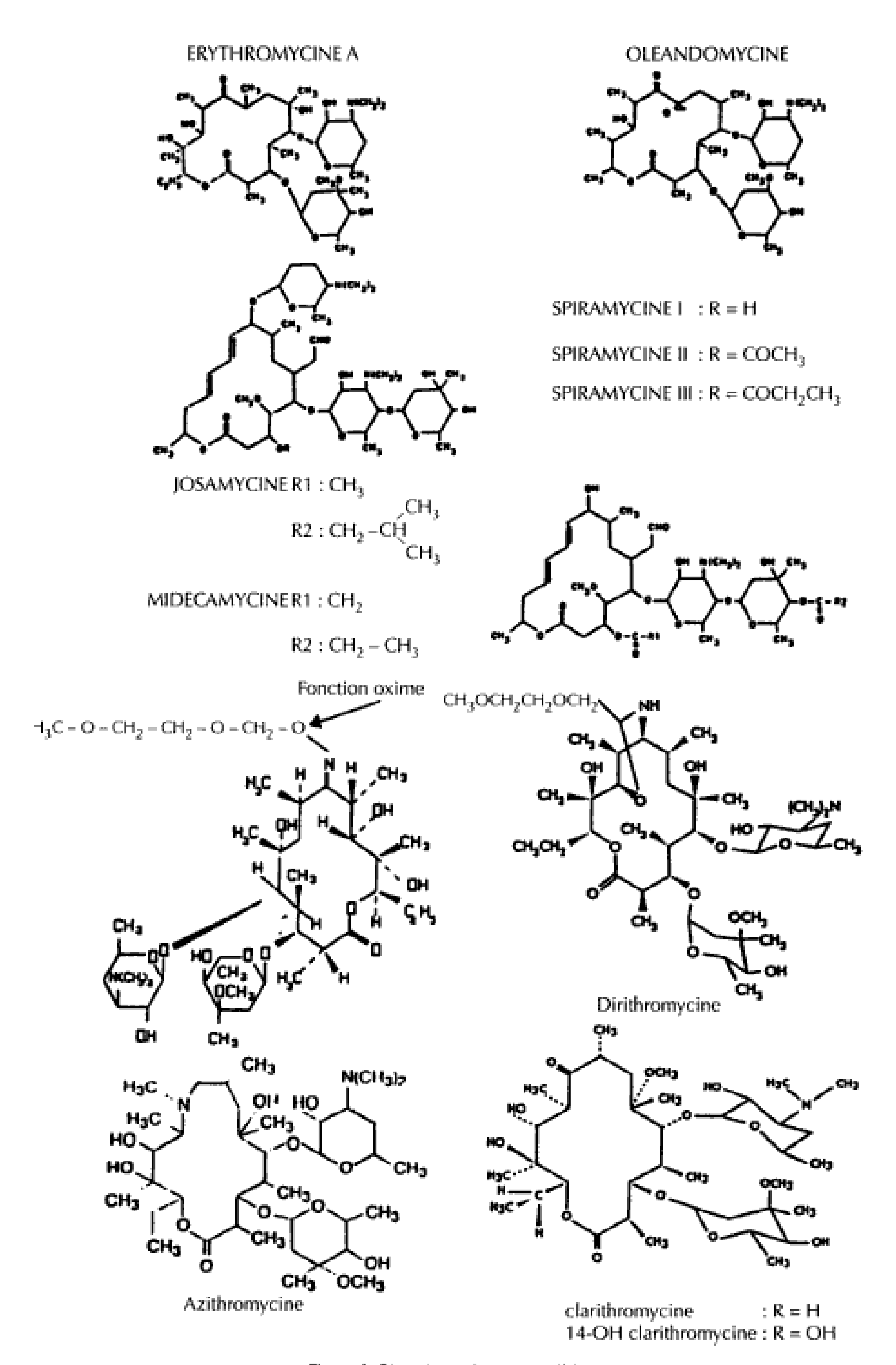


Figure 1. Structure des macrolides

A. Macrolides à 14 atomes

L'érythromycine est le chef de file des macrolides à 14 atomes de carbone. Il est utilisé en thérapeutique sous forme d'esters stables à pH acide ; la modification de certains groupements fonctionnels permet d'obtenir des produits présentant une meilleure biodisponibilité :

- transformation de la fonction cétone en position 9, en dérivé *oxime* : *roxithromycine* ;
- fixation d'un radical méthoxy en 6 : *clarithromycine*.

La clarithromycine, la roxithromycine et la dirithromycine sont des dérivés plus stables en milieu acide et mieux tolérés que l'érythromycine avec une activité antimicrobienne plus large.

La synthèse de la dirithromycine par condensation du (2-méthoxyéthoxy)-acétaldéhyde et de l'érythromycylamine permet d'obtenir un composé plus lipophile avec une demi-vie d'élimination plus longue.

B. Macrolides à 15 atomes

L'azithromycine est le chef de file de cette nouvelle classe de macrolides : les azalides. Il s'agit d'un dérivé de l'érythromycine A comprenant un atome d'azote dans le cycle lactone. Cette différence de structure lui conférerait une stabilité en milieu acide, une meilleure pénétration tissulaire et une meilleure tolérance digestive.

C. Macrolides à 16 atomes

Le chef de file est représenté par la spiramycine. Les macrolides à 16 atomes auraient une meilleure tolérance digestive et moins d'interactions médicamenteuses car ils n'interfèrent pas avec le cytochrome P450. Cependant, des cas d'interactions ont été recensés avec la josamycine. Par prudence, l'association aux dérivés de l'ergot reste contre-indiquée.

II. Propriétés bactériologiques

A. Spectre antibactérien

L'activité antibactérienne de tous les macrolides est à peu près identique à celle du chef de file, l'érythromycine. Ce spectre est assez diversifié mais exclut une grande partie des bacilles Gram négatifs (entérobactéries, *Pseudomonas)*, principales bactéries responsables d'infections nosocomiales en milieu hospitalier.
L'azithromycine et la clarithromycine seraient plus actifs in vitro sur *Haemophilus influenzae*.
La sensibilité aux macrolides s'est sensiblement modifiée ces dernières années pour les pneumocoques et les staphylocoques (35 % des pneumocoques sont résistants à l'ensemble des macrolides).

Les macrolides ont une activité in vitro et in vivo sur *Toxoplasma gondii*.

Tableau 2. Spectre antibactérien des macrolides

	E. habituellement sensibles	E. modérément sensibles	E. inconstamment sensibles	E. résistantes
COCCI +	Streptocoques Staphylocoques Métis-S		*Streptococcus pneumoniae* Entérocoques	Staphylocoques Méthi-R
COCCI –	*Branhamella catarrhalis* Méningocoques	Gonocoques		*Acinetobacter*
B. Gram +	*Corinebacterium dyphteriae* *Actinomyces*		*Clostridium perfringens*	
B. Gram –	*Moraxella* *Legionella**	*Haemophilus influenzae et para influenzae*** *Vibrio*	*Campylobacter coli*	Entérobactéries *Pseudomonas*
Autres	*Mycoplasma pneumoniae* *Chlamydia* *Treponema pallidum* *Leptospira* *Bordetella* *Helicobacter pylori***** *Campylobacter jejuni*	*Ureoplasma urealyticum* *Mycobacterium avium****		*Fusobacterium* *Bacteroïdes fragilis*

* : Dirithromycine, azithromycine, spiramycine : modérément sensibles
** : Josamycine, spiramycine, midecamycine : résistantes
*** : Pour clarithromycine et roxithromycine
**** : Pour clarithromycine seulement

B. Mécanisme d'action

Les macrolides agissent en inhibant la synthèse des protéines bactériennes ; ils se fixent sur la fraction 50S des ribosomes et inhibent l'action de la peptidyl-transférase. Les acides aminés apportés par l'ARN de transfert ne peuvent plus s'incorporer aux chaînes polypeptidiques, et la synthèse protéique essentielle à la survie de la bactérie s'arrête.
Ce sont des antibiotiques bactériostatiques mais l'administration parentérale permet d'atteindre des concentrations proches de la bactéricidie.
Aux concentrations subbactériostatiques, on observe un phénomène de bactériopause initialement décrit pour la spiramycine.

C. Résistance

1. Résistance naturelle

Elle concerne la plupart des bacilles à Gram négatifs (entérobactéries, *Pseudomonas*) et est due à l'imperméabilité de la paroi des bactéries.

Précautions d'emploi			
Érythromycine	Alfentanil	Diminution de la clairance	Dépression respiratoire prolongée
Tous	Digoxine	Altération de la flore intestinale métabolisant la digoxine Augmentation de l'absorption	Surdosage en digoxine
Érythromycine	Lisuride	Augmentation des taux plasmatiques	Surdosage dopaminergique, nausée, vomissements, somnolence, dyskinésie
Érythromycine	Midazolam	Diminution du métabolisme hépatique	Majoration de la sédation (chez l'enfant)
Érythromycine Midécamycine Clarithromycine Roxithromycine	Warfarine Acénocoumarol	Idem	Augmentation du risque hémorragique
Josamycine	Carbamazépine	Idem	Surdosage en carbamazépine
Josamycine Midécamycine Roxithromycine Clarithromycine	Ciclosporine	Idem	Augmentation de la créatininémie Augmentation de la ciclosporinémie
Clarithromycine	Ritonavir	Augmentation des taux plasmatiques de clarithromycine par inhibition du métabolisme hépatique	Surveillance clinique
	Rifabutine	Augmentation des taux plasmatiques de la rifabutine	Majoration des risques d'uvéite

VII. Précautions d'emploi

- En cas d'insuffisance hépatique, réduire la posologie des macrolides et mettre en place une surveillance régulière des tests hépatiques.
- La survenue de signes cliniques évoquant une atteinte hépatique impose l'arrêt immédiat du traitement.
- En cas d'insuffisance rénale, utiliser avec prudence.
- La prise de l'érythromycine pendant le repas permet d'augmenter la tolérance digestive. Éviter les jus de fruits.
- En raison de la toxicité cardio-vasculaire potentielle de l'érythromycine, il est recommandé d'administrer le lactobionate d'érythromycine en perfusion intraveineuse lente de une heure au minimum. Une double dilution est indispensable.
  - Une solution initiale à 50 mg/mL d'érythromycine base est préparée en ajoutant 10 mL d'eau pour préparations injectables (ppi) au contenu du flacon d'érythrocine IV 0,5 g, ou 20 mL d'eau ppi au flacon de 1 g.
  - Pour la solution finale à administrer, on utilisera exclusivement une solution salée isotonique ou une solution glucosée à 5 %.

La surveillance de l'électrocardiogramme (ECG) est recommandée pendant toute la durée de la perfusion chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires : l'allongement de l'espace QT doit conduire à l'arrêt de la perfusion.

- L'association avec la rifabutine ne doit être faite que chez des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine à un stade avancé de la maladie.

VIII. Contre-indications

- Hypersensibilité à un macrolide ou à un des constituants.
- Association avec les alcaloïdes de l'ergot de seigle avec risque de nécrose des extrémités.
- Association aux antihistaminiques H1 non sédatifs (mizolastine, ébastine) et au cisapride : risque majoré de troubles du rythme ventriculaire, notamment de torsades de pointe.
- Association au pimozide : possibilité d'arythmie.
- L'association de l'érythromycine IV à des médicaments donnant des torsades de pointes est formellement contre-indiquée.

IX. Interférences avec les examens biologiques

Les tétracyclines peuvent produire dans les urines une fluorescence interférant avec le dosage des catécholamines urinaires.

X. Formes galéniques et posologies

A. Voie orale

Des problèmes de stabilité en milieu acide, d'absorption digestive et de tolérance gastroduodénale ont conduit à une importante variété de sels et de formes galéniques d'érythromycine.
Les formes galéniques sont variées : granules, comprimés, sirop, gélules, microgranules gastrorésistants.
Les macrolides sont absorbés avant les repas, sauf en cas d'intolérance digestive.

B. Voie parentérale

Le solvant de perfusion est le glucose à 5 % pour l'adipate de spiramycine, le chlorure de sodium à 0,9 % ou le glucose à 5 % pour le lactobionate d'érythromycine et la clarithromycine.

Cet antibiotique agit par inhibition de la synthèse protéique bactérienne au niveau des ribosomes : elle bloque la traduction de l'ARN et la formation des sous-unités ribosomales 30S et 50S. Lorsque la souche est sensible à l'érythromycine, l'affinité de la télithromycine sur sa cible ribosomale est environ dix fois supérieure à celle du macrolide de référence. Pour les souches résistantes, cette affinité est plus de vingt fois supérieure.

La télithromycine présente une forte activité sur les Gram + (*Streptococcus pneumoniae* sensible ou résistant à la pénicilline G comme à l'érythromycine), *Legionella pneumophila* et les germes atypiques (*Chlamydia*, *Mycoplasma*) retrouvés dans les infections respiratoires. *Hæmophilus influenzae* n'est que modérément sensible à la télithromycine (comme d'ailleurs aux macrolides vrais). Sa structure, lui permettant de se fixer sur les ribosomes bactériens, explique que la télithromycine n'induise que peu de résistances par mutation spontanée ou croisée. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et entérobactéries sont résistants.

La télithromycine s'administre en une prise quotidienne unique de deux comprimés (800 mg) pendant sept à dix jours. Son administration ne requiert aucune adaptation chez le sujet âgé, l'insuffisante rénal modéré ou l'insuffisant hépatique (sauf cumul avec insuffisance rénale). Ce médicament bénéficie d'une bonne tolérance générale même si l'incidence des effets indésirables (nausées, diarrhées, vertiges, troubles de la vision) lors des études (réalisées dans les angines et les pharyngites) a été supérieure sous télithromycine à celle observée sous pénicilline ou clarithromycine. Le risque d'effet arythmogène (allongement modeste de l'espace QT) ou le risque hépatique est analogue à celui décrit avec la clarithromycine.

La prescription d'un kétolide constitue une alternative dans le choix d'une stratégie antibiotique probabiliste ou chez les sujets intolérants aux lactamines, et permet d'épargner des molécules donnant lieu à résistances.

Conclusion

Les macrolides occupent une place prépondérante dans les prescriptions quotidiennes de ville. Leur spectre est particulièrement adapté aux infections les plus courantes rencontrées notamment chez l'enfant (angines...).

Ils se révèlent particulièrement actifs sur les espèces microbiennes en recrudescence pour les infections broncho-pulmonaires (*Legionella*, *Branhamella*) et dans les infections génitales (Chlamydia, Mycoplasme).

Ils représentent une bonne alternative dans certaines indications en cas d'allergie aux pénicillines. Les macrolides ont acquis de nouvelles indications, notamment pour le traitement des infections opportunistes au cours du Sida, et offrent la possibilité de diminuer les prises journalières et les durées de traitement, ce qui pourrait améliorer l'observance.

Glycopeptides

V. LE BOUAR, Service de pharmacie clinique et des biomatériaux, hôpital Bichat Claude Bernard, AP-HP Paris.
D. RICHARD, Hôpital Henri Laborit, Poitiers (actualisation 2007).

La famille des glycopeptides comprend deux antibiotiques, la vancomycine et la teicoplanine.
La vancomycine a été isolée à partir d'un champignon, Amycolatopsis (anciennement Streptomyces) orientalis.
Introduite en thérapeutique en 1956, elle a d'abord été utilisée dans le traitement des infections à staphylocoques résistant à la pénicilline. À l'époque, les impuretés contenues dans sa présentation provoquaient des effets indésirables fréquents. Mais l'apparition, au début des années 1960, des pénicillines insensibles à l'action des pénicillinases, comme la méticilline, a relégué la vancomycine à l'arrière-plan au profit de ces molécules moins toxiques. Cependant, l'apparition dans les années 1980 d'infections à staphylocoques résistant à la méticilline, conjointement à l'amélioration des techniques de purification, donnèrent un regain d'intérêt à la vancomycine pour traiter les infections à staphylocoques ainsi que d'autres infections à bactéries Gram positifs résistant aux autres antibiotiques.
Plus récemment, dans les années 1980, la teicoplanine a été commercialisée. Sa structure chimique, son mode d'action et son activité in vitro sont proches de ceux de la vancomycine. Elle présente l'intérêt d'une longue demi-vie associée à une administration possible par voie intramusculaire.

I. Structure et propriétés chimiques

Les glycopeptides ont une masse moléculaire élevée (1 450 daltons pour la vancomycine et 1 890 daltons pour la teicoplanine).
La vancomycine est un heptapeptide linéaire avec 5 cycles aromatiques, un disaccharide formé d'une molécule de glucose et d'une molécule de vancosamine, et des acides aminés résiduels.
La teicoplanine est isolée d'*Actinoplanes teichomyceticus*. La préparation antibiotique est un mélange de 6 composés glycopeptidiques, 5 formants le groupe A_2 et un dénommé A_3. La molécule commune est un peptide linéaire constitué de 7 acides aminés. Pour les 5 composants formant le groupe A_2, 3 résidus osidiques et une chaîne latérale variable d'acide gras y sont rattachés. Cette chaîne latérale d'acide gras, comprenant de 9 à 11 carbones, confère à la molécule certaines de ses caractéristiques physico-chimiques. Le composé A_3 comporte 2 résidus osidiques et aucun résidu acyl.
La vancomycine est hydrosoluble à pH acide mais moins si le pH est supérieur à 4, et la teicoplanine est liposoluble, ce qui permet une meilleure pénétration tissulaire.

II. Bactériologie

A. Mécanisme d'action

Le principal mécanisme d'action des glycopeptides est une inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi des bactéries à Gram positifs, avec pour conséquence la lyse bactérienne.
Les glycopeptides se lient de manière spécifique au niveau de la chaîne pentapeptidique du peptidoglycane sur le dipeptide D-alanyl-D-alanine, formant une poche rigide et masquant le site d'action des transpeptidases chargées de former les ponts peptidiques du peptidoglycane.
De plus, par leur taille, les glycopeptides empêchent la réaction de transglycosilation nécessaire à la synthèse du peptidoglycane. Cette double action entraîne l'inhibition de la croissance, puis la mort bactérienne.
Pour la vancomycine, deux autres mécanismes d'action ont été décrits : une inhibition de la synthèse de l'ARN et une altération de la perméabilité membranaire.
L'action bactéricide des glycopeptides est lente, entre 24 et 48 heures, ce sont des antibiotiques temps-dépendants.

B. Spectre d'activité

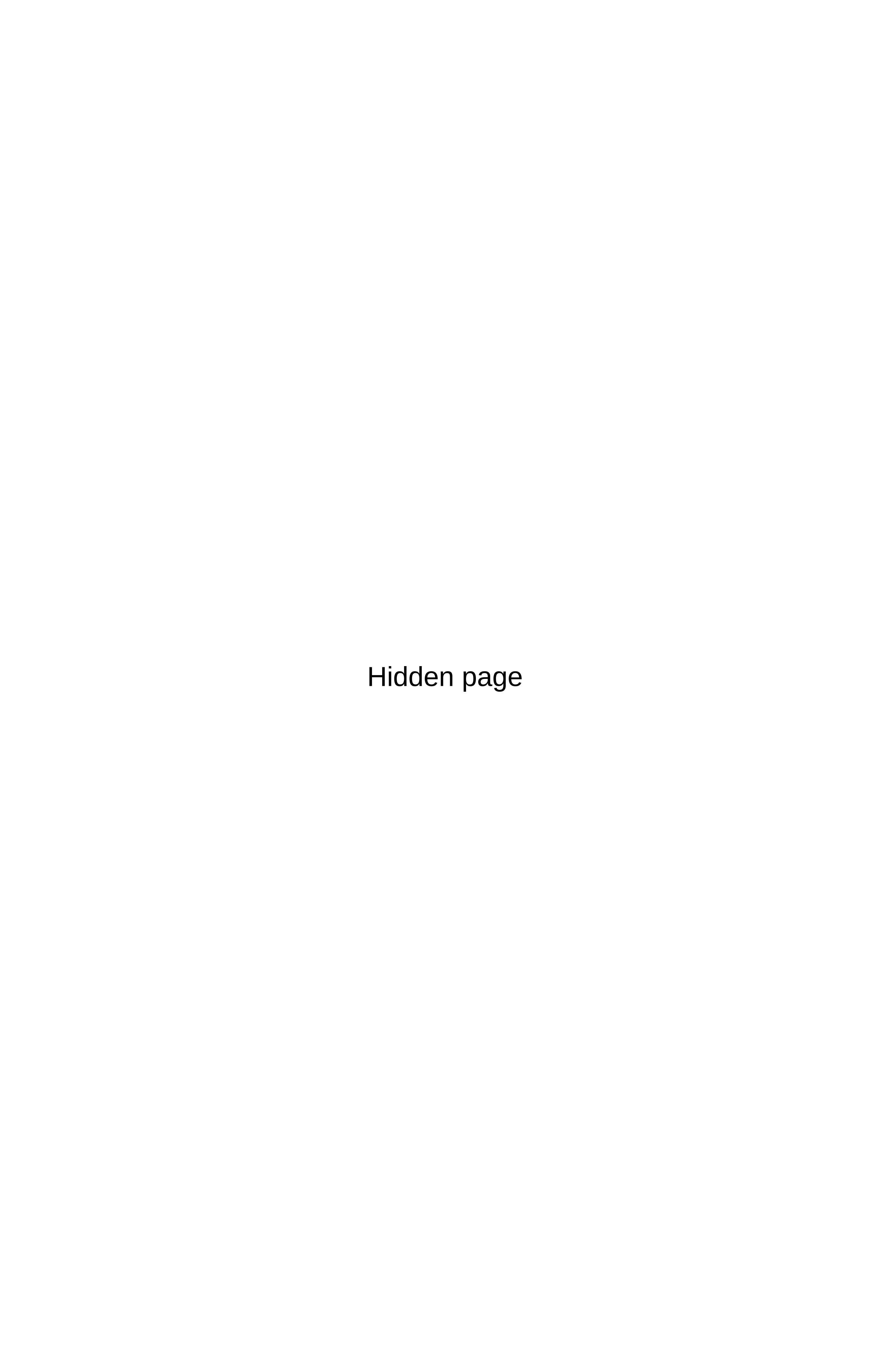
Les glycopeptides ont un spectre d'activité étroit limité aux bactéries à Gram positifs.
Le spectre d'activité comprend : les staphylocoques dorés et à coagulase négative, qu'ils soient sensibles ou résistants à la pénicilline ou à la méticilline, les streptocoques, y compris les pneumocoques et les entérocoques, les corynebactéries, les *Listeria* et certains *Clostridium*, en particulier *Clostridium difficile*.
Les glycopeptides sont inactifs sur les bactéries à Gram négatifs car ces molécules sont trop volumineuses pour emprunter les porines de la membrane externe et ne peuvent donc pas atteindre le peptidoglycane en voie de polymérisation.
En plus, des bactéries à Gram négatifs et certaines bactéries à Gram positifs sont naturellement résistantes aux glycopeptides : *Leuconostoc*, *Peptococcus*, *Lactobacillus*.

C. Résistances acquises

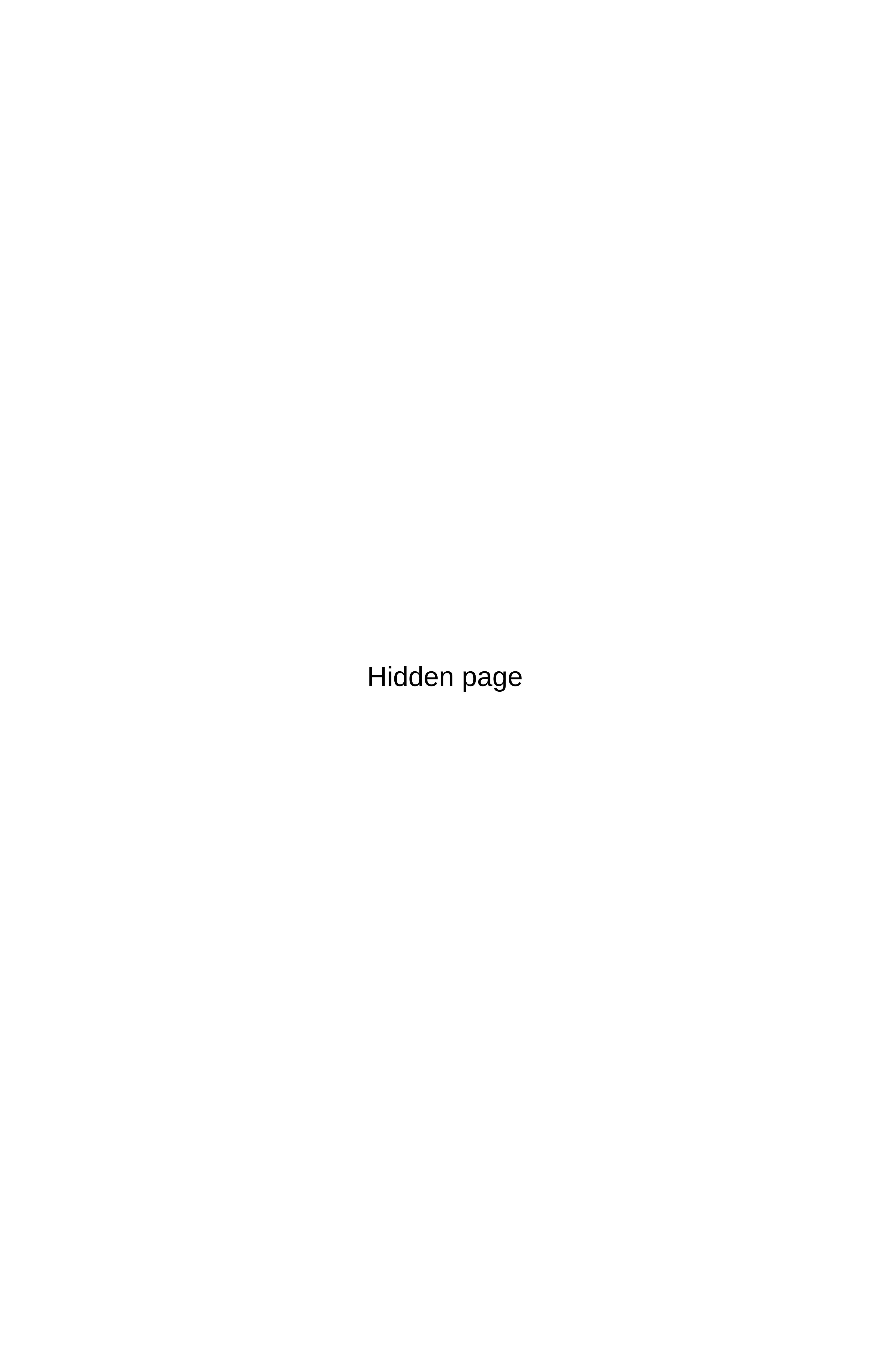
Après quarante ans d'utilisation, les résistances aux glycopeptides restent rares. Cependant, ces dernières années, des mécanismes de résistance ont été mis en évidence d'une part chez les entérocoques, et plus récemment chez les staphylocoques.

1. Entérocoques résistants

Les résistances aux entérocoques sont hétérogènes. Trois types de résistance acquise ont été décrits dont le mécanisme commun est une modification de la cible, due à l'acquisition par la bactérie d'un des trois types d'opérons des gènes décrits, Van A, Van B et Van D.
Le phénotype Van A présente un haut niveau de résistance à la vancomycine (CMI > 64 mg/L) et à la teicoplanine (CMI > 16 mg/L). Le support génétique de Van A



Hidden page


Hidden page

Sulfamides antibactériens et diaminopyrimidines

D. RICHARD, Pharmacie, centre hospitalier Henri Laborit et université, Poitiers.
G. AUGER, Interne des hôpitaux, Nantes.

En 1935, D. Domagk exposa pour la première fois le résultat d'essais réalisés sur le traitement des infections streptococciques par la sulfamidochrysoïdine (Prontosil®), un colorant industriel qui se révélait actif in vivo mais non in vitro. Cette molécule dérivait de colorants déjà utilisés par adjonction en para d'un groupe sulfamide connu en chimie tinctoriale pour augmenter la résistance au lavage.
Quelques mois plus tard, J. et T. Tréfouël ainsi que F. Nitti, devaient montrer à l'Institut Pasteur que le para-amino-benzène-sulfamide était actif in vitro, ce qui permit de préciser le pôle réellement actif du Prontosil® et de comprendre qu'il était métabolisé avant d'agir.
La sulfanilamide, utilisée en thérapeutique dès 1937 sous le nom de Septoplix®, inaugura l'ère de l'antibiothérapie, donnant lieu à la réalisation des premiers antibiogrammes et des premiers dosages plasmatiques de médicament et permettant de traiter des méningites jusqu'alors mortelles. Elle fut à l'origine des travaux sur les sulfones, élément essentiel du traitement de la lèpre et du diabète.
Le développement de nombreux autres groupes d'antibiotiques a rendu presque obsolète le recours aux sulfamides, exception faite de l'association à la triméthoprime.

I. Structure et propriétés physico-chimiques des sulfamides

A. Structure

Le squelette de ces antibiotiques organo-soufrés est le para-amino-benzène-sulfamide.
Les éléments structuraux indispensables à l'activité antibactérienne sont :
• un groupe amine primaire en para qui doit demeurer libre ;

H_2N — $N{=}N$ — SO_2 — NH_3 → H_2N — SO_2 — NH_2

NH_3

sulfamidochrysoïdine (Prontosil®) $\xrightarrow[\text{actif}]{\text{métabolite}}$ sulfanilamide (Septoplix®)

Figure 1. Du Protonsil® au Septoplix®

H_2N — SO_2 — N(R)(H)

R = H : sulfanilamide

Figure 2. Structure de base des sulfamides

Note : il existe cependant des composés qui, cette fonction étant bloquée, deviendront actifs *in situ* après hydrolyse (sulfamides utilisés comme antiseptiques intestinaux succinylsulfathiazol, salazosulfapyridine dont l'usage est décrit plus loin).

- un noyau benzénique ;
- un groupe sulfonamide monosubstitué sur l'azote 1 par un groupement généralement hétérocyclique.

Certaines molécules présentent une acylsubstitution : c'est le cas du sulfacétamide. Les radicaux substituant l'amide permettent de moduler les propriétés cinétiques de la molécule ; il s'agit d'une hétéroarylsubstitution types pyridine, thiazole ou pyrimidine, (sulfamides rapides), de types oxazole et isoxazole (sulfamides semi-retard) et de types pyrimidine et pyridazine méthoxylées (sulfamides retard qui ne sont plus commercialisés).
La forte densité électronique sur l'azote 1 du groupe sulfamide permet l'attache du sulfamide au centre électrophile du récepteur enzymatique bactérien.

NH_2 NH_2

$O{=}C{-}O^{\ominus}$ $R{-}NH{-}S({=}O){-}O^{\ominus}$

La forme anionique de l'antibiotique est à la base de son activité, car elle explique la liaison chimique permettant l'inhibition. Tout substituant augmentant la densité électronique autour du groupe sulfonamide favorisera donc cette activité.

Figure 3. Corrélation structure/activité entre l'acide para-amino-benzoïque et un sulfamide, selon Woods et Fildes (1940)

B. Propriétés physico-chimiques

Les sulfamides sont des poudres blanchâtres de saveur amère. Au pH physiologique, ils se trouvent suivant la molécule :
- sous forme ionisée de type acide (susceptible d'être salifiée) et hydrosoluble ;
- sous forme non ionique, liposoluble et beaucoup moins active.

Les molécules mal solubilisées au pH physiologique risquent de précipiter, notamment dans les tubes urinifères, et ne sont donc utilisées qu'en usage local.

II. Spectre antibactérien

A. Mécanisme d'action

Les sulfamides antibactériens sont des agents bactériostatiques aux doses thérapeutiques.
Ils agissent en inhibant par antagonisme compétitif la synthèse de l'acide folinique (théorie de Woods et Fildes, 1940), un facteur de croissance indispensable à de nombreuses espèces bactériennes et parasitaires compte tenu de leur parenté structurale avec l'acide para-amino-benzoïque (PABA) (*fig. 4*).

Rappelons que l'acide folique indispensable à l'homme provient de son alimentation.

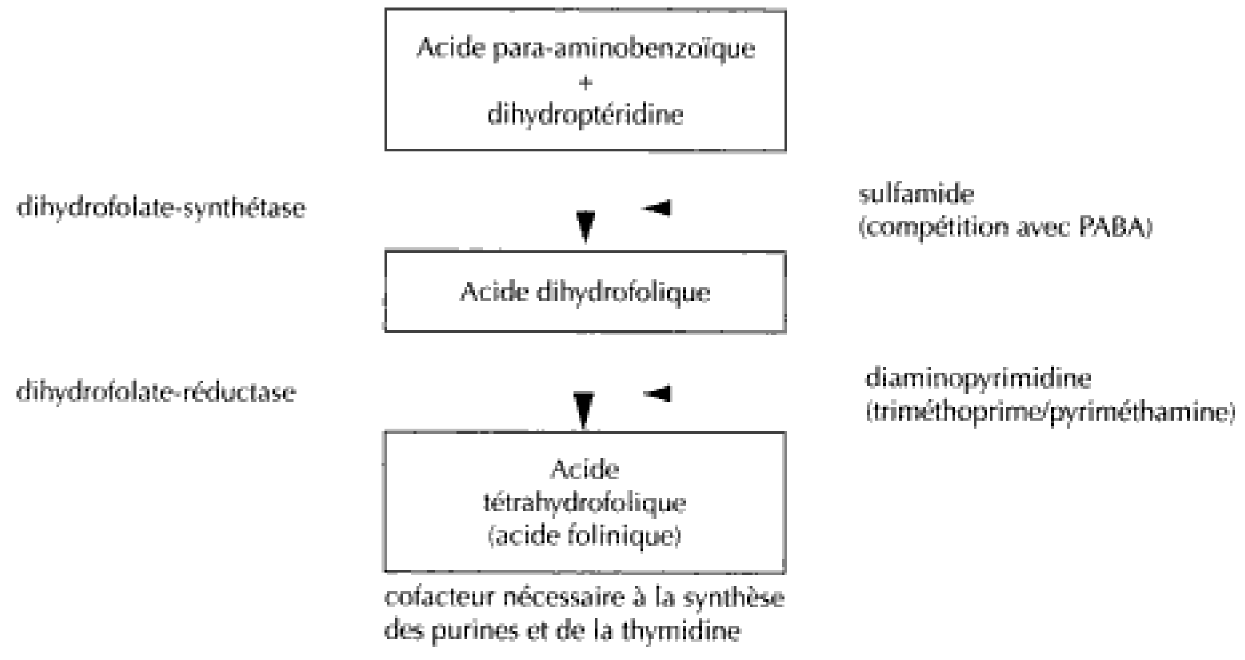


Figure 4. Schéma simplifié situant l'impact des sulfamides et des diaminopyrimidines

B. Spectre

Les sulfamides sont des antibiotiques bactériostatiques à spectre large. Ils sont en particulier actifs sur :

- les cocci Gram positifs, notamment *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* ;
- les cocci Gram négatifs ;
- les bacilles Gram positifs : *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium*, anaérobies stricts comme *Bacteroïdes* et *Fusobacterium* ;
- les bacilles Gram négatifs : entérobactéries (*Salmonella*, *Providencia* et *Proteus* sont inconstamment sensibles), *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Haemophilus sp*, *Pasteurella multocida*.

Neisseria meningitidis est devenue fréquemment résistante, comme les shigelles et les *Escherichia*.

On note l'action sur des bactéries comme *Actinomyces*, *Chlamydia* et *Nocardia* ainsi que sur des micro-organismes non-bactériens tels que *Plasmodium*, *Toxoplasma* et *Pneumocystis* sensibles à certains sulfamides (ce qui explique l'usage du cotrimoxazole dans l'infection opportuniste à *Pneumocystis carinii* chez le sujet immunodéprimé et les associations à base de sulfamides employées comme antipaludéens : sulfadoxine + pyriméthamine = Fansidar®).

C. Résistances

Il n'y a en pratique que peu d'espèces qui se révèlent spontanément résistantes aux sulfamides : défaut de perméabilité (*Pseudomonas aeruginosa*, mycobactéries, rickettsies, *Bacillus pertussis* et *Corynebacterium diphteriae*) ou de synthèse de l'acide folique (streptocoques D, *Lactobacillus*).

barrière. Les sulfamides franchissent aisément la barrière placentaire et diffusent dans les tissus fœtaux.
Le métabolisme des sulfamides résulte d'une acétylation au niveau hépatique, les autres transformations étant mineures (hydroxylation et conjugaisons). Les N-acétylsulfamides obtenus sont inactifs.
Il faut distinguer des sujets acétyleurs lents et d'autres rapides : l'acétylation modifiant les propriétés cinétiques de la molécule, on conçoit que, selon le type de malade soumis au traitement par les sulfamides, la toxicité de ces produits soit plus ou moins importante.
L'excrétion est essentiellement urinaire (exception faite, bien sûr, des molécules non résorbées dans l'intestin), avec filtration, sécrétion (sulfamides rapides) et, dans le cas des sulfamides retards, réabsorption. Il faudra favoriser cette élimination par une diurèse soutenue et, le cas échéant, une alcalinisation de l'urine. En effet, les métabolites acétylés sont susceptibles de précipiter en milieu acide dans les tubes urinifères. Les sulfamides sont hémodialysables.
Chez l'insuffisant rénal, le retard à l'élimination entraîne une majoration du taux d'acétylation.
Chez l'insuffisant hépatique, la diminution de cette transformation, compte tenu de la faible solubilité des dérivés de base, augmente la demi-vie.
Mentionnons un faible émonctoire biliaire, notamment pour les formes à longue demi-vie qui subissent un cycle entérohépatique, et une élimination mineure dans la salive, le lait et la sueur.

IV. Interactions médicamenteuses

- Les interactions importantes concernent les anticoagulants oraux (déplacés de leur liaison protéique), les sulfonylurées hypoglycémiantes (*idem*) et les hydantoïnes (anticonvulsivants : phénytoïne, fosphénytoïne) (leur métabolisme est inhibé, d'où risque de toxicité accrue). Elles résultent de phénomènes métaboliques et peuvent imposer une adaptation posologique ;
- L'association au méthotrexate augmente sa toxicité hématologique : les sulfamides peuvent en effet diminuer sa liaison protéique ;
- Les antiacides augmentent la fraction ionisée et diminuent la résorption des sulfamides ;
- Les effets indésirables rénaux peuvent être potentialisés par l'association à d'autres médicaments également susceptibles de se révéler néphrotoxiques.

V. Effets indésirables

La toxicité des sulfamides est croisée entre les diverses molécules. Son incidence était naguère très importante en raison des fortes posologies administrées à une époque où l'antibiothérapie était moins riche en alternatives qu'aujourd'hui.
Les réactions sont dépendantes du taux d'acétylation et de l'hydrosolubilité relative des métabolites, avec cette réserve que les seuls sulfamides encore disponibles en

France sont la sulfadiazine (voie locale, en crème : Flammazine®, Sicazine®), le sulfafurazole (Pédiazole®), le sulfaméthyzol (Rufol®) et le sufaméthoxazole (Bactrim®).
- Risque de cristallurie : minimisé avec les molécules les plus hydrosolubles, il peut néanmoins s'observer encore chez les sujets déshydratés ; l'usage du médicament doit s'accompagner d'une prise liquidienne assurant un débit urinaire quotidien d'environ 1,1 à 1,5 litre chez l'adulte. Il est possible d'alcaliniser l'urine pour favoriser l'élimination de certains sulfamides ;
- Atteinte hématologique : la survenue d'une anémie hémolytique est rare ; elle peut résulter d'un phénomène de sensibilisation ou d'un déficit érythrocytaire en 6-glucose phosphate déshydrogénase. L'agranulocytose, rare également, est le plus souvent rapidement réversible. Une aplasie médullaire totale a pu être décrite, avec parfois décès du patient. Elle résulte d'une activité myélotoxique directe d'origine inconnue ;
- Réactions d'hypersensibilité : les manifestations dermatologiques restent nombreuses lors d'un traitement par sulfamides, et peuvent aller jusqu'au syndrome de Lyell. Elles surviennent en général après la première semaine de traitement, mais parfois plus précocement. Elles sont plus banales chez les sujets immunodéprimés. Les réactions d'hypersensibilité s'accompagnent souvent d'une fièvre. Les formes locales peuvent être aussi à l'origine de réactions allergiques ;
- Atteinte hépatique : rare, elle peut se traduire par un ictère et une hépatomégalie et évoluer de façon péjorative ;
- L'administration de sulfamides aux nouveau-nés peut être à l'origine d'un déplacement de la bilirubine fixée sur l'albumine plasmatique. Une fois libre, la bilirubine se fixe alors dans le cerveau, provoquant une encéphalopathie (ictère nucléaire) : il faut éviter l'administration de sulfamides à la femme enceinte et proche de la délivrance car ils franchissent la barrière placentaire. Pour les mêmes raisons, l'allaitement est contre-indiqué lorsque le nouveau-né a moins d'un mois. Au-delà de cet âge, l'allaitement est simplement déconseillé ;
- Manifestations diverses : nombreuses, elles se traduisent notamment par des céphalées, une anorexie, des troubles digestifs.

VI. Indications

Les indications de la sulfamidothérapie sont extrêmement réduites compte tenu de l'apparition de nombreuses résistances, de la toxicité de ces produits et de la commercialisation d'autres antibiotiques. L'usage courant fait toujours administrer l'association sulfamide + diaminopyrimidine (cotrimoxazole, voir plus loin).
- Infections urinaires basses et non compliquées : indications possibles, en alternative avec des traitements à base de bêtalactamines (pivmécillinam) ou de triméthoprime non associée ; un sulfamide à tropisme urinaire (sulfaméthizol = Rufol®, possède un faible taux d'acétylation) est indiqué dans les cystites féminines à *Escherichia* ;
- Infections méningées : l'usage d'aminosides et d'aminopénicillines ou de céphalosporines est habituel mais dans certains cas (méningites à *Nocardia* par exemple), on peut recourir aux sulfamides par voie parentérale (sauf voie intrarachidienne, formellement contre-indiquée) ;

- Infections génitales à *Chlamydia* (alternative aux tétracyclines et aux macrolides) et à *Haemophilus ducreyi* ;
- **Otites** : indication du Pédiazole®, associant un macrolide, l'érythromycine, au sulfafurazole.

Note : le traitement de la toxoplasmose congénitale de l'enfant en association avec l'acide folinique (alternative à un macrolide, la spiramycine) est une indication hors AMM du Fansidar® (sulfamide + pyriméthamine), mais qui ne concerne pas son spectre antibactérien.

L'usage par voie locale des sulfamides n'est jamais conseillé car il risque de susciter une hypersensibilisation. Un sel d'argent de la sulfadiazine est cependant appliqué sur les brûlures (Flammazine®, Sicazine®, Flammacerium®).

Une spécialité anti-acnéïque est à base de sulfamide (sulfacétamide, Antébor®).

Un dérivé particulier, la salazopyrine, est indiqué dans le cadre particulier des colites et recto-colites hémorragiques (du type maladie de Crohn) ; cette molécule est dégradée par les bactéries du côlon en sulfapyridine et acide amino 5-salicylique. L'usage de ce seul acide en lavements ou *per os* (Pentasa®) permet une activité thérapeutique égale, avec moins d'effets indésirables.

VII. Contre-indications

- Allergie reconnue aux sulfamides et aux sulfites (formes injectables) ;
- Insuffisance rénale grave (risque de lithiase, les produits étant parfois peu hydrosolubles) ;
- Insuffisance hépatique grave ;
- Porphyrinurie ;
- Déficit en G6PD (risque d'hémolyse), y compris chez l'enfant allaité ;
- Hémopathies avec leucopénie ;
- Albuminurie, antécédents récents de néphrite ;
- La grossesse représente une contre-indication relative car le pouvoir tératogène de ces produits n'a jamais été prouvé chez la femme ;
- Nouveau-nés à systèmes enzymatiques non encore matures ;
- Allaitement (passage dans le lait maternel).

VIII. Traitement antibiotique aux sulfamides

Il est devenu rare, pour ne pas dire exceptionnel, hors association à la triméthoprime (voir plus loin).

A. Posologie

Sulfafurazole (Pédiazole®) : le sirop est indiqué chez l'enfant de plus de 2 mois, à la posologie de 150 mg/kg/j en prises fractionnées.

B. Précautions

- Contrôle hématologique régulier lors des traitements prolongés ;
- Surveillance biologique si atteinte grave du parenchyme hépatique, de dyscrasie sanguine, d'insuffisance rénale sévère ;
- Assurer une diurèse alcaline abondante (2 L/j) pendant la durée du traitement.

C. Intoxication

Les sulfamides antibactériens sont inscrits sur la liste 1, avec exonération pour les formes faiblement dosées ou destinées à un usage externe.
En cas de surdosage, on instaure un traitement symptomatique associant lavage gastrique, diurèse, administration intramusculaire de folinate de calcium, éventuellement épuration extra-rénale.
Note : en cas de surdosage par une spécialité contenant de la triméthoprime (ou un analogue), on n'alcalinise pas les urines car cette substance risquerait alors de précipiter massivement.

IX. Association aux diaminopyrimidines : cotrimoxazole

Le chef de file de ce groupe chimiquement dérivé de la pyriméthamine (antipaludéen associé à la sulfadoxine dans le Fansidar®) est la triméthoprime (TMP), substance faiblement basique. Connue depuis 1942, elle n'est utilisée en thérapeutique que depuis une quarantaine d'années.
Cette substance développe des propriétés antimicrobiennes mais, en pratique, elle est associée au sulfaméthoxazole (SMZ), compte tenu de son action antifolinique logiquement synergique à celle des sulfamides (*fig. 5*).
Cette association a une DCI : le cotrimoxazole (Bactrim®, Eusaprim®).
D'autres associations analogues sont commercialisées à l'étranger.

Figure 5. Triméthoprime

A. Mécanisme d'action

Alors que les sulfamides inhibent la première réaction commandée par la DHF-synthétase, la TMP va bloquer la réaction suivante, contrôlée par la DHF-réductase. L'inhibition chez la bactérie de deux réactions enzymatiques successives explique l'activité synergique de l'association qu'est le cotrimoxazole (*fig. 4*).


Hidden page


Hidden page

VI. Contre-indications
VII. Précautions d'emploi
VIII. Interactions médicamenteuses
IX. Interférences avec les tests biologiques
X. Posologie
XI. Associations de tétracyclines

Les tétracyclines représentent une famille homogène d'antibiotiques par leur structure et leurs propriétés bactériologiques. Cependant, il est possible de définir deux groupes de tétracyclines correspondant à l'évolution de cette classe :

- *les tétracyclines naturelles présentant une mauvaise tolérance digestive et nécessitant un nombre de prises important ;*
- *les tétracyclines hémisynthétiques caractérisées par une meilleure tolérance digestive, une pharmacocinétique permettant une réduction du nombre de prises et une meilleure diffusion tissulaire en raison de leur liposolubilité.*

I. Relation structure activité

Les tétracyclines sont dérivées d'un squelette à 4 cycles : la naphtacène carboxamide.

Figure 1. Structure des tétracyclines

Les différentes molécules sont issues de cette structure par modification des substituants (OH, H, Cl, ou CH_3) en position 5, 6 ou 7 *(tab. 1)* :

- *les tétracyclines naturelles,* obtenues par fermentation puis extraction : tétracycline, oxytétracycline ;
- *les tétracyclines d'hémisynthèse* dérivées de ces antibiotiques de base : métacycline, (ou méthylène cycline), lymécycline (ou tétracycline 1 méthylène lysine), doxycycline, minocycline, tigécycline ;
- les glycylcyclines sont représentées par la tigécycline, dont l'usage est réservé aux hôpitaux.

Minocycline, doxycycline et métacycline sont caractérisées par une plus grande liposolubilité due à l'absence de groupement hydroxyle en 6.

Les groupements hydroxyles peuvent réagir avec des cations (Zn^{++}, Fe^{++}, Mg^{++}, Ca^{++}…) pour former des chélates, d'où la nécessité d'éviter d'absorber les tétracyclines avec des aliments lactés. En présence de lumière ou d'humidité, les tétracyclines se dégradent en composés néphrotoxiques.

Tableau 1. Les différents tétracyclines et leurs posologies

	DCI	Spécialité	Voie d'admin.	Posologie adulte	Posologie enfant > 8 ans
3e génération (glycylcy-clines)	Tigécycline	Tygacil®	IV Réservé aux hôpitaux	100 mg puis 50 mg toutes les 12 h pendant 5 à 14 j	–
2e génération	Doxycycline	Vibramycine N® Monocline® Doxy 100® Doxycycline® Doxylis® Granudoxy® Spanor® Tolexine®	*Per os*	200 mg/j en 1 prise	4 mg/kg/j en 1 prise
	Minocycline	Mynocine® Mestacine® Minolis® Zacnan®	*Per os*	100 à 200 mg en 1 ou 2 prises	4 mg/kg/j en 1 prise
1re génération	Lymécycline	Tétralysal®	*Per os*	600 mg/j en 2 prises	
	Métacycline	Physiomycine® Lysocline®	*Per os*	600 mg/j en 2 prises	7,5 à 15 mg/kg/j en 2 prises
	Chlortétracycline	Auréomycine 3 %®	Voie cutanée	2 ou 3 applications/j sans dépasser 8 j	

Vibraveineuse® 100 mg/5 mL contient du chlorure de magnésium et de la polyvidone.
Prendre la doxycycline *pendant le repas* afin d'éviter d'éventuels accidents digestifs.
Prendre la lymécycline et la métacycline *en dehors des repas* en 2 à 4 prises régulièrement espacées.

II. Propriétés bactériologiques

A. Mécanisme d'action

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques. Ils inhibent la synthèse protéique des bactéries : après la diffusion passive à travers la membrane externe de la bactérie, les tétracyclines sont transportées de façon active à travers la membrane cytoplasmique. Après fixation sur la fraction 30S des ribosomes, elles empêchent la fixation du complexe aminoacide RNA de transfert sur le complexe RNA messager-ribosome. De plus, elles interfèrent avec les systèmes enzymatiques de la bactérie par un mécanisme de complexation ionique.

B. Spectre

L'examen des germes habituellement sensibles aux tétracyclines permet de définir les indications établies à ce jour. Il faut noter tout spécialement l'intérêt des tétracyclines sur les germes à développement intracellulaire.

1. Fécale

La doxycycline est éliminée à 90 % dans les fèces sous forme conjuguée inactive. 60 à 70 % de la minocycline sont excrétés dans les fèces. Dans les urines, la minocycline est excrétée sous forme inchangée (8 à 12 %) et sous forme de métabolites inactifs. L'élimination fécale englobe la fraction de médicament administrée par voie orale et non résorbée.

2. Rénale

L'élimination des tétracyclines est réalisée par filtration glomérulaire. Chez l'insuffisant rénal, on observe une augmentation de la demi-vie d'élimination avec élévation des taux sériques pour la plupart des tétracyclines, sauf la doxycycline.

IV. Utilisation en thérapeutique

A. Infections génito-urinaires basses (maladies sexuellement transmissibles)

- Urétrite et cervicite, salpingite à Chlamydia, à mycoplasmes, à *ureaplasma* à l'origine d'infections sexuellement transmissibles.
- Tréponématose : syphilis, en cas d'allergie aux β-lactamines.

B. Autres indications

- Rickettsiose (en association).
- Brucellose.
- Ornithose.
- Infections ophtalmiques à Chlamydia (trachome).
- Infections pulmonaires à Chlamydia et mycoplasmes.
- Pasteurellose.
- Tularémie.
- Nocardiose.
- Gonococcie.
- Spirochétose : maladie de Lyme, leptospirose.
- Prophylaxie de la peste et du choléra.
- Traitement curatif de la peste et du paludisme chloroquinorésistant.
- Affections buccodentaires.

C. Infections compliquées de la peau et des tissus mous et des infections intra-abdominales compliquées

La tigécyline (Tygacil®) est indiquée, en milieu hospitalier, dans le traitement d'infections graves où elle constitue une alternative aux associations aztréonam-vancomycine ou imipénem-cilastatine.

- Choc anaphylactique ou bronchospasme chez des sujets asthmatiques ou ayant un terrain atopique lié à la présence de sulfites dans les formes de cycline injectable IM.
- Rares pneumopathies interstitielles aiguës.

E. Troubles hématologiques (exceptionnels)

Anémie, leucopénie, thrombopénie, éosinophilie, apparition d'anticorps antinucléaires.

F. Atteinte des dents et des phanères

- Dyschromie dentaire, hypoplasie de l'émail dentaire : l'affinité des tétracyclines pour ces tissus s'accompagne de dépôt de complexe tétracycline-calcium avec l'apparition de coloration brune anormale au niveau des dents et des ongles.
  Ces troubles peuvent exister in utero si la mère est traitée après le cinquième mois de grossesse, et chez l'enfant traité avant 8 ans.
- Des cas de pigmentation brune à gris bleuté de la peau, des muqueuses et des phanères, ont été observés. Il convient alors d'arrêter le traitement.
- Des pigmentations diffuses prédominant au visage ont également été recensées.

G. Hypertension intracrânienne

De rares cas ont pu être observés lors de l'utilisation des tétracyclines. En général, ces signes (céphalées, vertiges) disparaissent à l'arrêt du traitement.

H. Anomalies biochimiques isolées

- Augmentation des transaminases, des phosphatases alcalines, de la bilirubinémie.
- Augmentation de l'urée sanguine, sauf avec la doxycycline : une hyperazotémie extrarénale, en relation avec un effet antianabolique, a été signalée avec les cyclines. Cette hyperazotémie peut-être majorée par l'association avec les diurétiques.

I. Néphrotoxicité

- Néphrites interstitielles aiguës.

J. Toxicité hépatique

De rares cas d'hépatite immunoallergique associée à un syndrome lupique ont été recensés.

K. Propres à la minocycline

La minocycline peut entraîner une toxicité vestibulaire (70 %) à l'origine de vertiges, de sensations ébrieuses, d'ataxie.

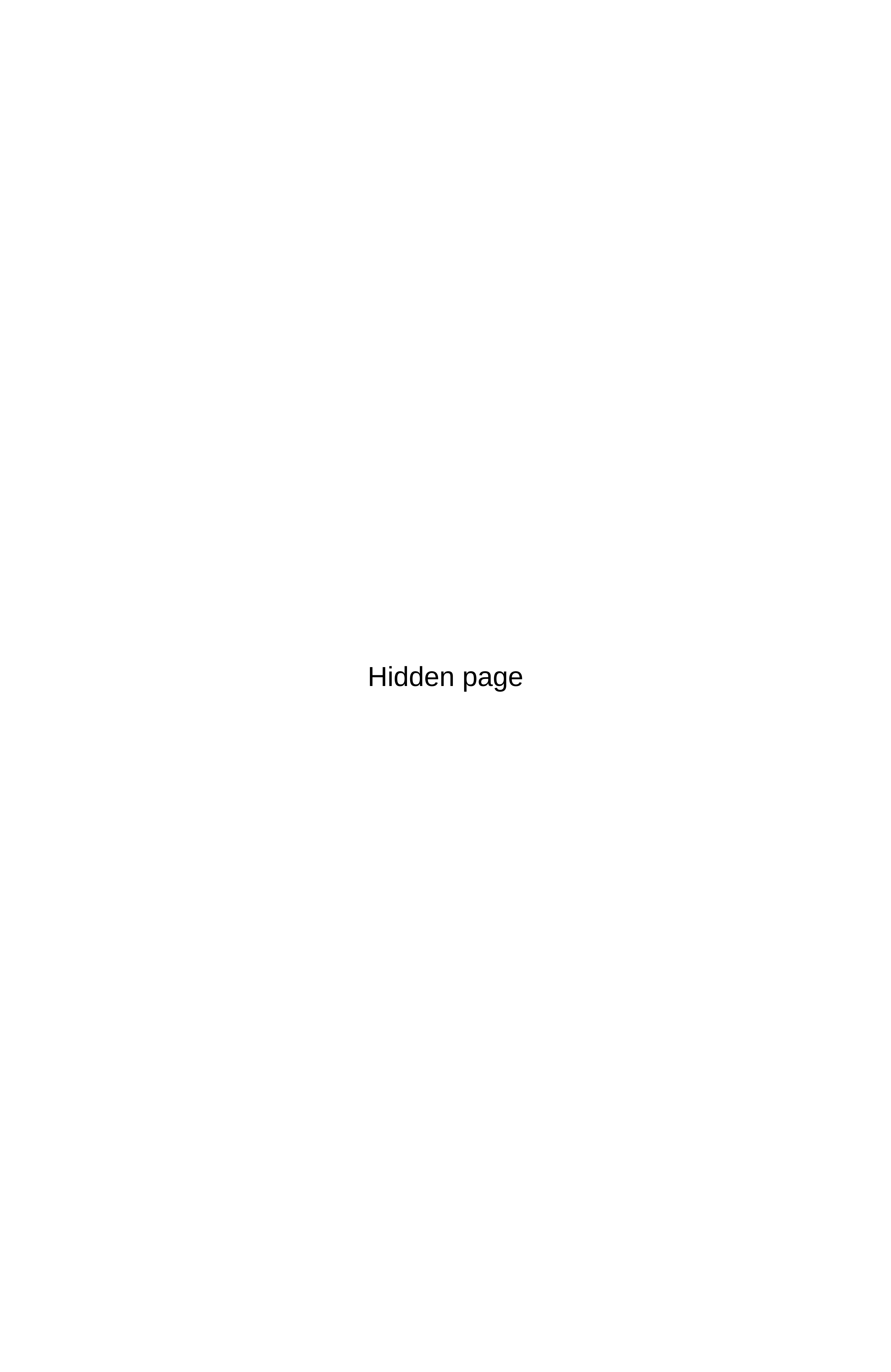
De rares cas d'hypersensibilité à la minocycline ont été rapportés tels qu'un syndrome lupique et une pancréatite aiguë.

VI. Contre-indications

- Hypersensibilité aux cyclines ou à l'un des constituants (lidocaïne, sulfite, polyvidone, colorant…).
- Insuffisance rénale (sauf doxycycline par voie orale).
- Les cyclines passent dans le placenta ; leur administration au cours des 2e et 3e trimestres de grossesse expose le fœtus au risque d'anomalie du bourgeon dentaire, ou de dyschromie dentaire chez l'enfant.
- En cas d'allaitement, proscrire les cyclines.
- L'emploi des cyclines doit être évité chez l'enfant de moins de 8 ans en raison du risque de coloration permanente des dents et d'hypoplasie de l'émail dentaire.
- L'association avec les rétinoïdes par voie générale (acitrétine ou isotrétinoïde pouvant être prescrit dans le traitement de l'acné) est contre-indiquée en raison du risque d'hypertension intracrânienne.
- Chez les sujets allergiques à la lidocaïne, proscrire les formes injectables IM.
- Les formes injectables sont contre-indiquées chez les sujets asthmatiques ou ayant un terrain atopique :
  - la forme IM contient des sulfites pouvant provoquer des chocs anaphylactiques ;
  - la forme IV ne contient plus de sulfites depuis 1992 mais reste cependant contre-indiquée.

VII. Précautions d'emploi

- Insuffisance hépatique :
  - Il est recommandé de surveiller le bilan hépatique ;
  - En cas d'élévation des transaminases, des phosphatases alcalines, de la bilirubine et à plus forte raison en cas d'ictère, il convient d'arrêter le traitement.
- Attirer l'attention des conducteurs ou des utilisateurs de machines sur les risques de sensations vertigineuses avec impression d'idéation ralentie.
- Les cyclines doivent être administrées à distance des sels de fer, des pansements gastriques (contenant des cations di et trivalents : hydroxydes de magnésium, d'aluminium, de calcium) et de la didanosine – Videx® – avec un délai d'au moins 2 heures.
- Il est recommandé de respecter les dates de péremption et de veiller à un stockage dans de bonnes conditions de température et d'hygrométrie des tétracyclines : des néphropathies avec acidose tubulaire rénale peuvent survenir lors de l'emploi des tétracyclines périmées.
- Éviter toute exposition directe au soleil ou aux rayonnements UV pendant le traitement qui doit être interrompu en cas d'apparition de manifestations cutanées à type d'érythème.


Hidden page

En pratique, certaines interactions existent avec les cyclines, qu'il faut prendre en compte. Les cyclines sont formellement contre-indiquées avec les rétinoïdes, risque d'hypertension intracrânienne. Un intervalle de 2 heures devrait être respecté entre les cyclines et les sels de fer ou les pansements gastriques permettant de conserver la biodisponibilité de l'antibiotique.
Le bon usage de ces antibiotiques permet ainsi d'assurer l'efficacité du traitement et de limiter l'émergence de résistance.

Pour en savoir plus

- Société de pathologie infectieuse de langue française. Antibiothérapie par voie générale en pratique courante : infections ORL et respiratoires basses. *Médecine et maladies infectieuses* 1999 ; (29) 4 : 205-60.
- *Les cahiers de l'ICAAC* ; Infections nosocomiales, communautaires et urinaires, 2000.
- Piette A.-M., Ramanoelina J., Gepner P., Larroche C., Bletry O. Réactions systémiques secondaires à la prise de minocycline. *Rev Med Interne* 1999 ; 20 (10) 869-74.
- Champel V., Jonville Bera A.-P., Bera F., Autret E. Atteintes œsophagiennes secondaires à l'ingestion de tétracyclines. *Thérapie* 1997 ; 52 (6) : 587-9.
- Commission de la transparence et Agence du médicament. Fiches de transparence. *Les tétracyclines* 1999 ; 151-4.

Antifongiques systémiques

C. TRIVIN, J. CALOP
Pôle pharmacie, CHU Grenoble.
P.-A. FALCONNET, B. LEBEAU, R. GRILLOT
Service de parasitologie-mycologie, CHU Grenoble.
Revu par C. CHAPUIS, D. BOURNEAU, C. KARIBAYE, S. SKAALI, C. TRIVIN, J. CALOP
Pôle pharmacie, CHU Grenoble, et par B. LEBEAU, R. GRILLOT,
Service de parasitologie-mycologie, CHU Grenoble.

La place des antifongiques s'est accrue de manière significative au sein de l'arsenal anti-infectieux ; en effet, durant ces deux dernières décennies, on a assisté à une très nette augmentation de l'incidence des mycoses opportunistes (candidoses, cryptococcoses et aspergilloses) mais aussi, bien qu'à un degré moindre, de certaines mycoses endémiques d'importation comme l'histoplasmose.
Cette recrudescence est consécutive à l'évolution des techniques médicales et chirurgicales, certes plus efficaces, mais aussi plus agressives (chirurgies lourdes, soins intensifs, thérapeutiques immunosuppressives et anticancéreuses, radiothérapie...), ainsi qu'à l'émergence de maladies favorisant la survenue d'affections opportunistes, en particulier le Sida.
Dans le traitement des mycoses, le choix des antifongiques est guidé par plusieurs critères : la nature du champignon en cause et ses résistances éventuelles, la localisation du foyer infectieux et la nature du terrain sur lequel la maladie survient. Si le traitement des mycoses superficielles cutanées ou muqueuses ne présente plus de réelles difficultés (excepté les candidoses oropharyngées du Sida), il n'en est pas de même pour les mycoses profondes. En effet, celles-ci présentent toujours un caractère de gravité et sont rapidement évolutives car elles surviennent sur un terrain affaibli ou profondément immunodéprimé.
Le développement de molécules antifongiques se heurte à de nombreuses difficultés, ce qui explique le nombre encore limité de molécules disponibles, notamment pour lutter contre les infections disséminées à l'origine parfois de situations délicates.
Cependant, plusieurs développements récents viennent étoffer l'arsenal thérapeutique à la disposition des cliniciens : il s'agit de nouvelles molécules disponibles.

Tableau 1. Antifongiques à usage systémique

	Classe	Principe actif	Spécialité	Voie d'administration	Remarques
Antibiotiques antifongiques	Polyènes	Amphotéricine B	Fungizone®	Parentérale IV	
			Ambisome®	Parentérale IV	Amphotéricine B liposomale
			Abelcet®	Parentérale IV	Amphotéricine B complexe lipidique
	Benzohydrofurane	Griséofulvine	Grisefuline®	*Per os*	
Produits de synthèse	Fluoropyrimidine	Flucytosine	Ancotil®	*Per os*, parentérale IV	
	Azolés	Kétoconazole	Nizoral®	*Per os*	
		Itraconazole	Sporanox®	*Per os* parentérale IV	
		Fluconazole	Triflucan®	*Per os* parentérale IV	
		Voriconazole	Vfend®	*Per os*, parentérale IV	
		Posaconazole	Noxafil®	*Per os*	
	Allylamines	Terbinafine	Lamisil®	*Per os*	
	Echinocandines	Caspofungine	Cancidas®	Parentérale IV	

Seuls les antifongiques systémiques seront abordés dans cette question ; le traitement local des mycoses superficielles (cutanées, muqueuses et des phanères) ne sera pas exposé dans cette synthèse.

I. Produits d'origine naturelle : les antibiotiques antifongiques

Cette classe comporte des produits anciens comme la griséofulvine, l'amphotéricine B et la nystatine dont le mode d'action est imparfaitement connu. Les deux premiers sont largement utilisés : la griséofulvine pour le traitement des teignes et l'amphotéricine B pour la thérapeutique de nombreuses mycoses surtout digestives et profondes.

A. Griséofulvine

Isolée de *Penicillium griseofulvum* en 1939, la griséofulvine n'a trouvé une application thérapeutique qu'en 1958 grâce à Gentles qui eut l'idée de l'administrer par voie orale dans le traitement des teignes, provoquant ainsi une révolution dans la prise en charge de ces infections.
Son excellente activité contre les dermatophytes et sa pharmacocinétique expliquent que cet antifongique représente encore aujourd'hui le traitement majeur des teignes du cuir chevelu.

1. Spécialités

Griséfuline® 500 mg et 250 mg comprimés (liste I).

2. Structure chimique

C'est un dérivé du benzohydrofuranne.

Figure 1. La griséofulvine

C'est une molécule insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool et les solvants organiques.

3. Pharmacologie

a) Mécanisme d'action

Mal connue, au niveau de la cellule fongique, son activité pourrait être liée à une inhibition de la synthèse de composants de la paroi (chitine), une activité antimitotique (arrêt de la métaphase).

Après passage systémique, la griséofulvine s'incorpore à la kératine néoformée et suit passivement la progression des cellules vers la surface ; la kératine formée pendant le traitement devient alors résistante à l'invasion par les dermatophytes dont l'activité kératolytique est inhibée. Cependant, l'antifongique ne détruit pas les champignons qui ont infecté les couches externes de kératine, d'où l'intérêt d'ajouter à la griséofulvine *per os* un antifongique topique.
De plus, la croissance de la kératine étant lente, le traitement doit être prolongé.
Note : cet antifongique présente une action anti-inflammatoire (analogie stucturale avec l'acide salicylique) de type non cortisonique, et un effet spasmolytique à forte dose sur les microvaisseaux, d'où son utilisation possible dans les algodystrophies réflexes et le syndrome de Raynaud.

b) Spectre

Action fongistatique sur les dermatophytes : *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*.

c) Résistances

De nombreux champignons autres que les dermatophytes tels que *Candida spp*, *Malassezia furfur* (agent du *Pitiriasis versicolor)*, *Aspergillus* et autres moisissures opportunistes.
Rarissimes dans le groupe des dermatophytes.

4. Pharmacocinétique

a) Résorption

Après administration orale, la résorption est rapide (pic plasmatique : 2 à 4 heures) mais variable selon les individus. Elle est améliorée par la forme microcristalline ou par la prise au cours d'un repas riche en graisses.

b) Distribution

La liaison aux protéines plasmatiques est de 80 %. La diffusion tissulaire est bonne, de préférence vers la peau et les phanères (détectée entre 25 et 30 jours à la surface de la peau). Les taux sanguins sont bas et la demi-vie plasmatique varie de 9 à 22 heures. Il existe un passage transplacentaire d'où sa contre-indication en cas de grossesse. Le volume de distribution est de 0,7 L/kg.

c) Métabolisme

La griséofulvine est déméthylée au niveau du foie où elle exerce un effet inducteur enzymatique du cytochrome 3A.
Chez l'insuffisant hépatique, il conviendra d'être vigilant en cas de traitement de longue durée.

d) Excrétion

La majeure partie du produit non métabolisé est éliminée dans les selles.
Moins de 1 % de la dose administrée est éliminée sous forme inchangée dans les urines.

Hidden page

En deux prises orales, de préférence lors d'un repas contenant des graisses. La durée du traitement sera fonction de la localisation des lésions :
- dermatophytoses de la peau glabre : 2 à 4 semaines ;
- dermatophytoses des plis : 4 à 8 semaines ;
- teignes : 6 à 8 semaines voire 12 semaines ;
- onychomycoses : 4 à 12 mois.

8. Contre-indications

- Hypersensibilité connue à la griséofulvine, sujet porphyrique, lupus érythémateux et syndromes apparentés.
- Insuffisant hépato-cellulaire.
- Chez le prématuré à cause d'une osmolarité très élévée (2 800 mosmol/L) qui endommagerait l'endothélium vasculaire.

9. Mises en gardes et précautions d'emploi

- Surveillance mensuelle de l'hémogramme en cas de traitement de longue durée (supérieur à 1 mois) et à doses élevées (supérieures à 1,5 g/jour).
- Éviter l'exposition aux ultra-violets pendant la durée du traitement et dans ses suites immédiates.
- Accroître la surveillance chez l'insuffisant hépatique.
- Tenir compte de l'effet inducteur enzymatique que la griséofulvine est susceptible d'exercer sur de nombreuses substances.

10. Grossesse et allaitement

La griséofulvine est déconseillée pendant la grossesse (effet tératogène avéré chez l'animal et en cours d'étude chez l'homme) et pendant l'allaitement (pas de données concernant le passage dans le lait maternel). En cas de découverte fortuite d'une grossesse après prise de médicament, une attitude de prudence prénatale est de rigueur.

11. Interactions médicamenteuses

a) Associations déconseillées

- Alcool et médicaments contenant de l'alcool : effet Antabuse.
- Œstroprogestatifs anticonceptionnels : risque d'échec de la contraception pendant le traitement par griséofulvine et pendant le cycle suivant l'arrêt du traitement, en raison de l'effet inducteur enzymatique de la griséofulvine.
- Antifongiques azolés, en particulier le kétoconazole (potentialisation de la toxicité hépatique).

b) Associations nécessitant des précautions d'emploi

L'effet inducteur enzymatique de la griséofulvine risque de diminuer l'efficacité de nombreux médicaments associés, notamment : il faut accroître la surveillance de l'hémostase et éventuellement adapter la posologie avec les anticoagulants oraux,

(désoxycholate de sodium) entraîne la formation de micelles mixtes avec l'amphotéricine B, ce qui autorise sa mise en suspension colloïdale dans du sérum glucosé à 5 %. Cette préparation est alors adéquate pour l'administration parentérale ; elle est stable 24 heures à + 4 °C et à l'abri de la lumière.
En solution aqueuse, l'AmB existe à l'état de monomères solubles, d'oligomères solubles et d'agrégats insolubles qui se forment successivement lorsque la concentration totale d'AmB augmente. Les monomères et les oligomères solubles se lient à l'ergostérol des membranes et sont responsables de l'activité antifongique. En revanche, seuls les oligomères solubles se lient au cholestérol et induisent une toxicité. Les agrégats insolubles sont inactifs. Les excipients lipidiques permettent d'accroître la proportion d'AmB monomérique.

3. Pharmacologie

a) Mécanisme d'action

L'AmB induit une fongicidie concentration-dépendante. L'AmB désoxycholate est moins active sur les champignons en phase stationnaire ; elle est inactive sur les biofilms de *Candida* (tels qu 'ils peuvent se former sur les cathéters et les endoprothèses).
Son mécanisme d'action complexe n'est pas entièrement élucidé.
La cible principale des polyènes est la membrane cytoplasmique, plus particulièrement l'ergostérol auquel ils se lient, formant des complexes insolubles entraînant la formation de pores et une fuite de cations cytoplasmiques : ions potassium et sodium.
D'autres effets sont attribués aux polyènes, comme une auto-oxydation générant des radicaux libres (anion superoxyde), provoquant des dégâts cellulaires.
Enfin, différents effets immunomodulateurs avec une stimulation des mécanismes de défense immunitaire de l'hôte ont été mis en évidence *in vitro* mais leur rôle *in vivo* n'est pas démontré :
- augmentation des concentrations de TNF-α dans les macrophages ;
- induction/stimulation de la synthèse des prostaglandines PGE2 ;
- augmentation de la production d'IL-1-β dans les cellules mononucléées.

Note : l'amphotéricine B a la capacité de se lier à d'autres stérols tels que le cholestérol de la membrane des cellules de mammifères, mais avec une affinité moindre que celle pour l'ergostérol. Ainsi, l'amphotéricine B n'a pas de sélectivité complète pour les cellules fongiques, ce qui explique une partie de sa toxicité.

b) Spectre

Très large, il s'étend à la plupart des champignons commensals humains ou pathogènes, en particulier les agents responsables de mycoses profondes (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus sp*). Pour cette raison, l'amphotéricine B reste le chef de file incontesté des antifongiques, d'autant plus qu'elle est active sur les agents des mycoses endémiques (blastomycoses, histoplasmoses, sporotrichoses…).
Ce spectre ne se limite pas aux micromycètes puisque l'amphotéricine B est également active sur certains protozoaires comme les leishmanies.

5. Effets indésirables

La toxicité est nulle par voie orale et lors d'application sur la peau et les muqueuses. En revanche, par voie intraveineuse, les réactions de toxicité sont importantes et gênent considérablement son utilisation.

a) Réactions immédiates d'ordre général

Elles sont dose-dépendantes : il s'agit de fièvre, frissons, céphalées, nausées, troubles digestifs, malaise général, flush, myalgies, arthralgies, hypotension, et plus exceptionnellement collapsus cardiovasculaire voire arrêt cardiaque. Il est donc conseillé :

- de réaliser une dose-test de 1 mg lors de la première perfusion afin d'évaluer la tolérance du patient ;
- de perfuser lentement de 2 à 6 heures ;
- d'administrer au préalable un antipyrétique, un antihistaminique, un corticostéroïde et éventuellement un antiémétique ;
- d'agiter de temps en temps le flacon en cours de perfusion dans le cas de la suspension colloïdale ;
- de maintenir le flacon à l'obscurité.

La tolérance générale s'améliore souvent en cours de traitement.

b) Réactions locales

Douleur au point d'injection avec ou sans phlébite ou thrombophlébite. Ces irritations veineuses sont réduites par l'augmentation de la dilution du produit, la diminution de la vitesse de perfusion, la pose d'un cathéter profond, l'addition d'une faible dose d'héparine dans la perfusion. S'assurer que le pH de la solution est supérieur à 4,2.

c) Néphrotoxicité

Elle est dose-dépendante et constitue le principal effet indésirable, limitant l'augmentation des posologies et imposant parfois l'arrêt du traitement. Elle s'observe constamment après plusieurs semaines de traitement, avec diminution de la filtration glomérulaire et atteinte du tubule distal. Ceci se traduit par une cylindrurie, une hyperazotémie, une hypercréatininémie, une hypokaliémie, une hypomagnésémie, une hyposthénurie, une acidose tubulaire distale, une néphrocalcinose histologique voire une insuffisance rénale permanente. Cette atteinte est le plus souvent réversible à l'arrêt du traitement mais peut parfois être mortelle. Par conséquent, la surveillance de la fonction rénale doit être attentive ; quand la créatininémie dépasse 220 µmoles/L ou quand l'azotémie est supérieure à 1 g/L, la posologie sera diminuée ou l'antifongique remplacé par une autre forme galénique (lipidique) ou un autre antifongique selon la situation clinique. Il faut surveiller l'ionogramme plasmatique, administrer du potassium (en cas d'hypokaliémie), alcaliniser les urines (pour prévenir l'acidose métabolique) et assurer une bonne perfusion rénale par un apport hydrique suffisant.

d) Toxicité hématologique

Une anémie normochrome normocytaire arégénérative est habituelle en cours de traitement. Une leucopénie peut plus rarement survenir, voire exceptionnellement une agranulocytose. Il conviendra donc de surveiller l'hémogramme.

e) Toxicité neurologique

Bourdonnements d'oreille, perte de l'audition, troubles de la vision, vertiges transitoires, convulsions et neuropathies périphériques ont été rapportés.

f) Réactions allergiques

Rash, prurit, choc anaphylactique.

g) Toxicité respiratoire

Il a été décrit des cas d'insuffisance respiratoire aiguë au cours de perfusions d'amphotéricine B chez des patients ayant reçu peu de temps auparavant une transfusion de leucocytes. Il faudra donc espacer le plus possible les deux perfusions.

h) Autre

Hépatotoxicité, arachnoïdite au point d'injection au décours d'administration intrarachidienne.

6. Indications

a) Amphotéricine B conventionnelle

Elle est indiquée dans la plupart des infections fongiques systémiques et/ou profondes à germes sensibles :

- candidoses : l'amphotéricine B est utilisée ou non en première intention (en fonction de l'espèce et du terrain) ; elle pourra être associée à la 5-fluorocytosine ;
- cryptococcoses : dans certaines situations cliniques (terrain), on utilise l'amphotéricine B associée à la 5-fluorocytosine ;
- aspergilloses invasives : amphotéricine B en seconde intention si le voriconazole est contre-indiqué ;
- mycoses endémiques.

Lors de protocoles visant à éviter les rechutes de cryptococcoses méningées chez les patients sidéens, l'amphotéricine B peut être utilisée ; cependant le fluconazole semble plus indiqué dans cette situation.

Utilisation éventuelle en prophylaxie secondaire de l'aspergillose chez l'immunodéprimé et dans le traitement présomptif d'une fièvre résistante aux antibiotiques chez le patient neutropénique.

Enfin, l'amphotéricine B est également utilisée dans le traitement de la leishmaniose cutanéo-muqueuse, en seconde intention.

b) Amphotéricine B liposomale et amphotéricine B complexe lipidique

Elles sont utilisées pour le traitement des aspergilloses et candidoses systémiques chez les patients ayant développé une insuffisance rénale sous amphotéricine B conventionnelle, ou en cas d'altération préexistante de la fonction rénale.

L'amphotéricine B liposomale possède en plus les indications suivantes :

- traitement empirique des infections fongiques présumées chez le patient neutropénique fébrile ;
- traitement des cryptococcoses neuroméningées chez le sujet HIV ayant développé une insuffisance rénale sous amphotéricine B conventionnelle, ou en cas d'altération préexistante de la fonction rénale ;
- traitement des leishmanioses viscérales en cas de résistance prouvée ou probable aux antimoniés.

7. Posologie et modes d'administration

a) Amphotéricine B conventionnelle

La perfusion d'amphotéricine B est préparée en mettant en suspension la poudre dans un soluté glucosé à 5 %. Les solutés de NaCl à 0,9 % ne doivent jamais être utilisés du fait du risque de précipitation.

L'administration se fait exclusivement en milieu hospitalier, en perfusion lente (de 2 à 6 heures).

Après une dose-test initiale de 1 mg dans 20 mL de soluté glucosé à 5 %, on débute à une posologie de 0,2 mg/kg/j ; la posologie est ensuite augmentée progressivement jusqu'à une dose de 0,5 à 1 mg/kg/j qui est fonction de la tolérance, de l'intensité de l'infection, de l'agent étiologique…

Après les deux ou trois premières perfusions à 24 heures d'intervalle, du fait de l'élimination lente du produit, on peut réaliser les perfusions toutes les 48 heures seulement.

La durée du traitement dépend de la nature de la mycose et de sa gravité ; elle est en moyenne de 6 à 12 semaines.

D'autres voies d'administrations sont possibles :

- intra-rachidienne : mal toléré, cet abord est réservé aux méningites mycosiques rapidement évolutives et pour lesquelles la stérilisation du LCR tarde à apparaître ;
- pulmonaire : sous forme d'aérosols pour les candidoses ou aspergilloses bronchiques en complément de la voie générale ;
- intra-péritonéale : lors des péritonites mycosiques postopératoires ou lors des péritonites à *Candida* chez le dialysé ;
- intra-vésicale : pour le traitement des cystites à *Candida* chez des patients porteurs de sondes vésicales.

b) Amphotéricine B liposomale et amphotéricine B complexe lipidique

Soluté de dilution : soluté glucosé à 5 %. L'administration se fait exclusivement en milieu hospitalier ; une dose-test initiale de 1 mg est préconisée.

La posologie usuelle est de :

- 3 mg/kg/j pour l'amphotéricine B liposomale ;
- 5 mg/kg/j pour l'amphotéricine B complexe lipidique.

En cas de persistance ou d'aggravation de l'insuffisance rénale, la poursuite du traitement sera discutée en fonction du rapport bénéfice/risque ; on pourra transitoirement réduire de moitié la posologie ou bien espacer les perfusions.

8. Contre-indications

- Hypersensibilité à l'amphotéricine B.
- Insuffisance rénale (amphotéricine B conventionnelle).

9. Grossesse

L'AmB n'est pas tératogène chez l'animal. Un effet malformatif dans l'espèce humaine n'est pas attendu mais par mesure de précaution, son utilisation ne sera envisagée qu'en cas de risque vital.

10. Interactions médicamenteuses

Les risques d'interactions médicamenteuses sont directement liés aux effets indésirables de l'amphotéricine B.

a) Effet hypokaliémiant

Médicaments donnant des torsades de points :
- associations déconseillées : terfénadine, vincamine, astémizole, bépridil, érythromycine IV, halofantrine, pentamidine, sparfloxacine, sultopride ;
- associations nécessitant des précautions d'emploi : amiodarone, brétylium, disopyramide, quinidiniques, sotalol ; nécessité de prévenir l'hypokaliémie et de surveiller l'espace QT.

Digitaliques :
Il s'agit d'une précaution d'emploi – nécessité de prévenir l'hypokaliémie et de surveiller l'électrocardiogramme si besoin.
Médicaments hypokaliémiants :
Surveiller et corriger la kaliémie notamment avec les diurétiques hypokaliémiants, les laxatifs stimulants, les gluco et minéralocorticoïdes ainsi que le tétracoside.

b) Majoration de la toxicité hématologique

Il convient de renforcer la surveillance de l'hémogramme avec la zidovudine.

c) Addition des effets néphrotoxiques

Précautions d'emploi avec les aminosides, la ciclosporine et le tacrolimus.

C. Apport des nouvelles formes galéniques d'amphotéricine B

La toxicité, en particulier rénale, observée avec la suspension colloïdale d'amphotéricine B, a incité le développement de nouvelles formulations galéniques.

1. Généralités sur les liposomes et la vectorisation de l'amphotéricine B

a) Définition

Les liposomes sont des vésicules lipidiques constituées de une ou plusieurs couches concentriques de nature phospholipidique, séparées les unes des autres par un espace aqueux.
Les liposomes varient par leur diamètre et le nombre de lamelles les constituant.

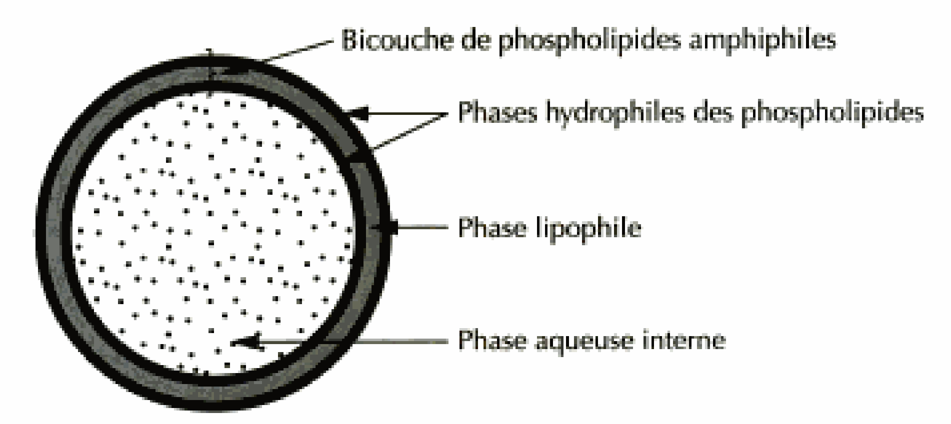


Figure 3. Schéma d'un liposome unilamellaire

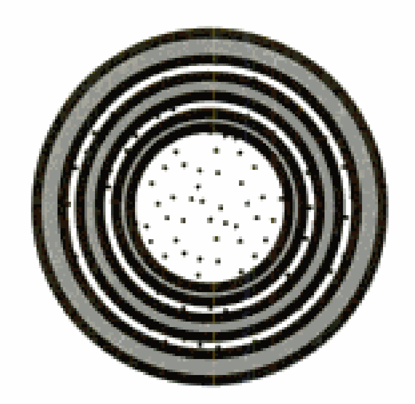


Figure 4. Liposome multilamellaire

b) Objectifs recherchés

Un principe actif amphiphile (comme l'amphotéricine B) sera aisément incorporé dans la bicouche phospholipidique. Il sera ainsi mieux protégé des agressions biologiques au sein de l'organisme, mais également, cela permettra de diminuer sa toxicité éventuelle en réduisant les interactions avec les structures biologiques.

L'autre intérêt des liposomes est de servir de vecteur au principe actif, permettant ainsi de modifier sa pharmacocinétique et éventuellement de cibler sa diffusion vers des tissus donnés.

c) Devenir *in vivo* des liposomes

Dans le compartiment sanguin, en fonction de leur structure, les liposomes vont être plus ou moins rapidement déstabilisés par échange de phospholipides avec les lipoprotéines plasmatiques (HDL principalement) et libérer ainsi leur contenu en principe actif.

Efflux des liposomes vers les tissus : seuls certains capillaires permettent le passage des liposomes : il s'agit des capillaires sinusoïdes du système réticulo-endothélial (rate, foie, moelle osseuse, poumon), des capillaires de certaines zones du cerveau, des reins et des glandes endocrines, ainsi que les capillaires dont la paroi perd son intégrité au décours d'un processus tumoral ou inflammatoire du tissu irrigué. Il est important de noter que seuls les liposomes dont la taille est inférieure à 100 nm peuvent réaliser ce passage à travers l'endothélium vasculaire.

Au niveau du foie, les cellules de Kupffer qui « débordent » dans la circulation peuvent capter et phagocyter les liposomes circulants (quelle que soit leur taille).

par les liposomes, lorsque l'on augmente les doses d'amphotéricine B liposomale, on assiste à une augmentation non linéaire de la concentration sérique maximale et de l'AUC ainsi qu'une diminution non linéaire du VAD. Par rapport à l'amphotéricine B conventionnelle, une moindre fraction d'antifongique est retrouvée au niveau rénal et pulmonaire, les concentrations tissulaires maximales sont obtenues dans le foie et la rate.
L'amphotéricine B liposomale n'est pas éliminée par la filtration rénale, elle n'est donc pas dialysable.
L'effet de cette formulation est prolongé (élimination lente des tissus, stabilité plasmatique, absence d'élimination rénale) et autorise une seule administration par jour.
Il n'y a pas d'études en ce qui concerne l'accumulation tissulaire, les voies métaboliques d'élimination et la modification des paramètres pharmacocinétiques chez les insuffisants rénaux et hépatiques.

d) Efficacité thérapeutique

Le spectre d'activité de l'amphotéricine B liposomale est identique à celui de l'amphotéricine B conventionnelle. En raison de sa moindre toxicité autorisant des posologies plus élevées et de l'apport de la vectorisation qui permet d'obtenir des concentrations plus importantes sur le site de l'infection, on peut s'attendre à une meilleure efficacité de la forme liposomale ; cette supériorité a déjà été démontrée chez l'animal. L'expérience clinique et quelques études réalisées en médecine humaine sont maintenant suffisantes pour démontrer que l'AmB liposomale et l'AmB complexe lipidique sont au moins aussi actives que la forme conventionnelle, et que dans certaines infections elles lui sont supérieures.
Cette formulation galénique autorise le traitement des personnes chez lesquelles l'amphotéricine B conventionnelle est contre-indiquée pour des raisons de tolérance ou d'insuffisance rénale préexistante.

e) Tolérance

La stabilité des liposomes dans le sang, la diminution de l'interaction de l'amphotéricine B avec les membranes cellulaires, sa moindre diffusion vers les tissus sains (notamment le rein) constituent l'intérêt majeur de la formulation liposomale caractérisée par une meilleure tolérance, notamment en termes de toxicité immédiate et de néphrotoxicité.

3. Amphotéricine B complexe lipidique : AbelceT®

a) Caractéristiques structurales

Lorsque la proportion d'amphotéricine B augmente dans une structure liposomale (entre 25 et 50 % d'amphotéricine B), il y a disparition de l'organisation sphérique au profit d'une structure lipidique en rubans : c'est le principe de la formulation d'amphotéricine B complexe lipidique. Dans cette organisation, contrairement aux liposomes, il n'y a pas de phase aqueuse ; la fraction lipidique se présente sous la forme d'un ruban de 1,6 à 11 µm dans lequel sont insérées les molécules d'amphotéricine B. Deux phospholipides constituent ce complexe : le dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) et le dimyristoyl phosphatidylglycerol (DMPG).

b) Devenir *in vivo* de l'amphotéricine B complexe lipidique

L'amphotéricine B complexe lipidique est rapidement retirée de la circulation générale par les sites à intense activité macrophagique (SRE, foie, rate et poumons) et par les cellules mononucléées circulantes. Au contraire de l'Ambisome®, le vecteur de l'Abelcet®, dépourvu de cholestérol, est rapidement hydrolysé (3 heures) et libère l'AmB qui se lie à l'albumine et aux lipoprotéines, mais cette hydrolyse est saturable aux doses thérapeutiques.

Au décours d'une infection, la molécule antifongique pourra être transportée par les cellules monocytaires jusqu'au foyer inflammatoire ou être directement capturée par les macrophages du site infectieux ; la modification de l'intégrité de la paroi vasculaire facilitera aussi une diffusion tissulaire sous forme libre non endocytée, par passage facilité à travers l'endothélium vasculaire.

Plusieurs mécanismes peuvent concourir à la dégradation des complexes lipidiques : échange de phospholipides avec les membranes cellulaires et fongiques, action de phospholipases (phagocytes, cellules endothéliales et fongiques) ; ce qui permet la libération de l'amphotéricine B à l'intérieur comme à l'extérieur des cellules phagocytaires, et donc une action à la fois sur les agents infectieux libres et phagocytés.

c) Pharmacocinétique

L'amphotéricine B complexe lipidique est intensément captée par le système réticulo-endothélial ; de plus, comme la diffusion tissulaire est supérieure à celle de l'amphotéricine B conventionnelle (sauf au niveau rénal), il ne semble pas exister, comme c'est le cas avec l'amphotéricine B liposomale, de saturation de l'activité macrophagique du SRE. Par conséquent, après injection, on assiste à une décroissance rapide des taux sériques d'amphotéricine B complexe lipidique, qui sont alors très inférieurs aux concentrations tissulaires. Si on augmente les doses administrées, alors les concentrations tissulaires évoluent dans le même sens, tout en épargnant le rein.

Les mécanismes de distribution tissulaire, notamment la diffusion rénale réduite, ainsi que les voies métaboliques et d'élimination de cette formulation galénique sont très mal identifiés.

Par rapport à l'amphotéricine B conventionnelle, les paramètres pharmacocinétiques de l'amphotéricine B complexe lipidique sont les suivants :

- une concentration maximale sérique 30 à 50 % plus faible ;
- un VAD 4 à 10 fois supérieur, augmentant avec la dose administrée ;
- des concentrations très supérieures dans le foie, la rate et les poumons ;
- des concentrations moindres au niveau rénal ;
- une demi-vie plasmatique terminale comparable, mais une demi-vie initiale plus courte.

Seule 3 % de la dose administrée sont éliminés dans les urines ; cette formulation n'est donc pas dialysable.

Bien que peu de données soient disponibles, chez l'insuffisant rénal et hépatique ces paramètres pharmacocinétiques ne semblent pas influencés.

3. Pharmacologie

a) Mécanisme d'action

La 5FC pénètre à l'intérieur des cellules fongiques par l'intermédiaire d'une cytosine perméase. La 5FC est alors désaminée en 5-fluorouracile (5FU) grâce à une cytosine désaminase. Deux mécanismes différents vont alors permettre au 5FU de perturber l'activité métabolique des champignons :

- transformation en 5-fluorouridine triphosphate qui est incorporée dans l'ARN à la place de l'uracyle : la synthèse protéique est alors bloquée par cet ARN « frauduleux » ;
- transformation en 5-fluorodésoxy-uridine monophosphate, puissant inhibiteur de la thymidylate synthétase, bloquant ainsi la formation d'ADN.

In vivo, comme les autres antifongiques, la 5FC n'est que fongistatique. La quasi-absence de cytosine perméase dans les cellules de mammifères explique la bonne tolérance de cette molécule dans l'espèce humaine.

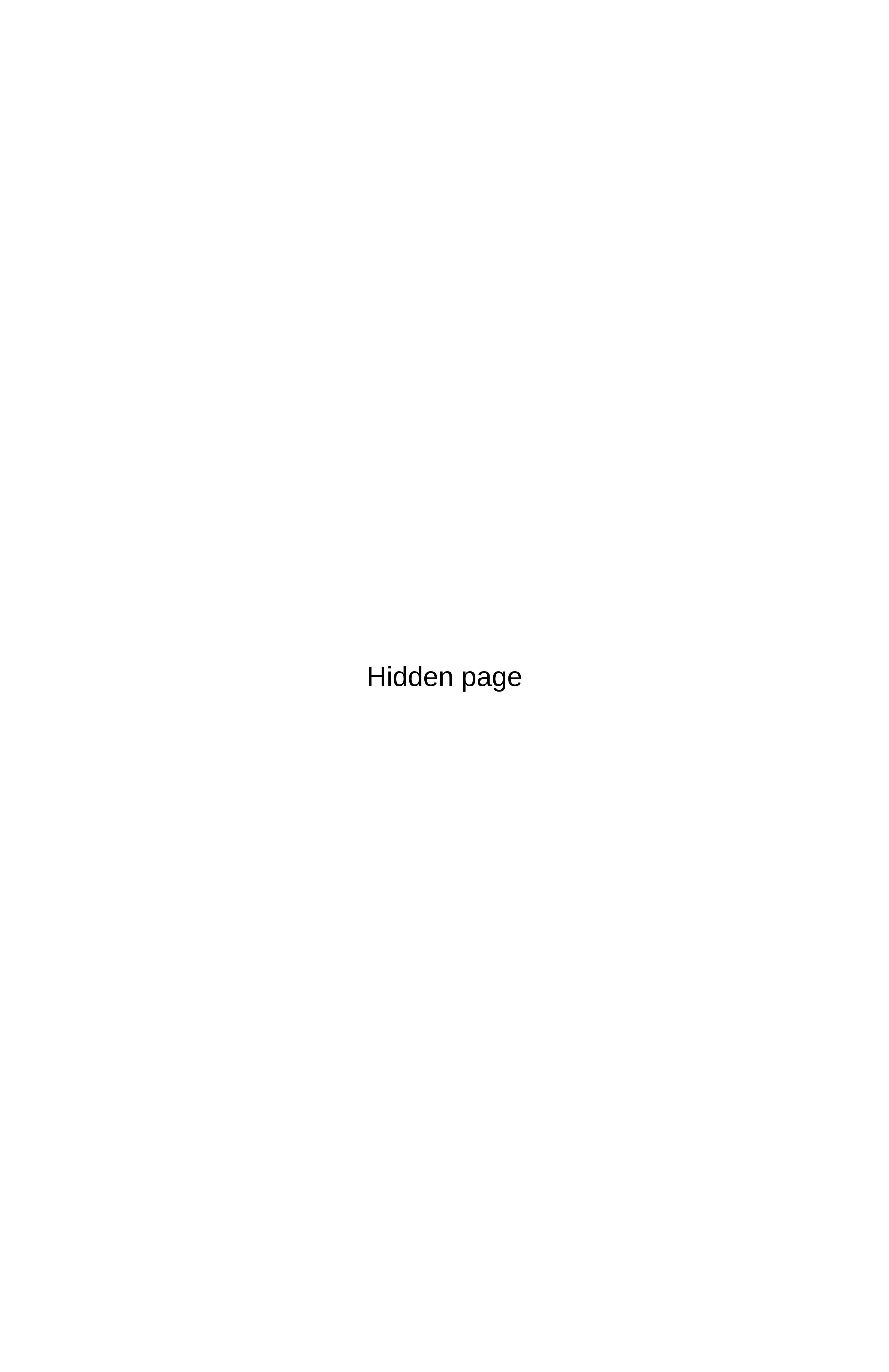
b) Spectre

La 5FC est caractérisée par un spectre beaucoup plus étroit que celui de l'amphotéricine B. Son activité optimale s'exerce à l'égard des levures appartenant aux genres *Candida* et *Cryptococcus*. Son action varie en fonction des souches sur certains champignons filamenteux comme *Aspergillus* et les agents responsables de chromomycoses (*Phialophora*, *Cladospoprium*). En revanche, elle n'est pas active sur les dermatophytes et les champignons responsables de mycoses endémiques (*Histoplasma*, *Coccidioides* et *Blastomyces*).

c) Résistances

L'emploi de la 5FC est limité par l'existence de résistances primaires et secondaires. En effet, le mode d'action de la 5FC nécessite de nombreuses transformations biochimiques ; ce sont donc autant d'enzymes fongiques sur lesquelles des mutations peuvent survenir, modifiant alors la sensibilité de la souche. Ces mutations sont génétiquement stables et indépendantes les unes des autres. Ces résistances peuvent être partielles ou totales. L'apparition permanente et spontanée de mutants résistants, indépendamment de la présence de 5FC (résistance primaire), s'élève à 2 % pour *Cryptococcus neoformans*, 5 % pour *Candida albicans* et 25 à 30 % pour *Candida krusei* et *Candida tropicalis*. La sélection de mutants résistants en cours de traitement (résistance secondaire) est un phénomène d'autant plus important que le nombre de micro-organismes est élevé, que les capacités de défense de l'hôte sont diminuées et que les concentrations en 5FC sont basses.

Par conséquent, il est indispensable d'utiliser la 5FC en association afin d'éviter au maximum la sélection de mutants résistants. Tout traitement par la 5FC doit être précédé de l'identification de l'agent responsable de la mycose et de la détermination de la sensibilité à la 5FC. Il est nécessaire d'administrer des doses suffisantes et maximales d'emblée et de poursuivre le traitement suffisamment longtemps ; il conviendra de renouveler périodiquement l'étude de la sensibilité à la 5FC jusqu'à la guérison.


Hidden page

c) Pharmacologie

■ *Mécanisme d'action*

Il est commun à tous les antifongiques de la classe : les azolés inhibent les enzymes dépendant du cytochrome P 450 dans la cellule fongique ; ils interfèrent ainsi avec la 14-α-déméthylase responsable de la transformation du lanostérol en ergostérol. Il y a alors accumulation de précurseurs et inversement une déplétion en ergostérol, constituant essentiel de la membrane fongique.

Note : les azolés peuvent également interagir avec les enzymes à cytochrome P-450 dans les cellules des mammifères, notamment lors de la synthèse du cholestérol. Les différentes molécules de cette classe vont avoir une action plus ou moins spécifique sur les enzymes fongiques, ce qui explique leur différence de toxicité notamment au niveau hépatique.

■ *Spectre*

Genres habituellement sensibles :

- *Candida, Malassezia* ;
- champignons agents de mycoses endémiques (en particulier *Blastomyces, Histoplasma, Coccidioïdes, Paracoccidioïdes*) ;
- parmi les champignons filamenteux, *Geotrichum* et certains champignons noirs (*Dreschelera spp.*) ;
- *Epidermophyton*.

Genres inconstamment sensibles :

- *Aspergillus* (*fumigatus* et *flavus*). Le kétoconazole possède une activité synergique avec l'amphotéricine B sur *Aspergillus flavus* et *Dreschelera longirostrata* ;
- *Trichophyton* et *Microsporum*.

L'étude des résistances *in vitro* est nécessaire car il existe des résistances possibles, notamment avec des espèces de *Candida non albicans* : *Candida tropicalis, Candida krusei* et *Candida glabrata*.

d) Pharmacocinétique

■ *Résorption*

Après administration orale, la biodisponibilité du kétoconazole est variable : elle est augmentée si la prise a lieu au cours du repas, notamment si la ration alimentaire est riche en graisses (lipophilie de la molécule). Une augmentation du pH gastrique entraîne une diminution de la résorption digestive : il faudra donc éloigner la prise du kétoconazole de l'administration d'anti-acides, de cimétidine ou d'anticholinergiques. Les taux plasmatiques maximums sont atteints en 1 ou 2 heures et la demi-vie plasmatique est de 8 heures.

■ *Distribution*

Son taux de liaison aux protéines plasmatiques est de 84 % et sa diffusion tissulaire est bonne dans la plupart des tissus, en particulier au niveau des glandes sébacées, ce qui explique son efficacité dans le traitement des mycoses cutanées. En revanche, le passage à travers la barrière méningée est très faible (concentration dans le LCR = 1 à 2 % des concentrations plasmatiques).

La concentration maximale sérique est atteinte en 1 ou 2 heures après la prise d'une dose de 200 mg par voie orale. Ces valeurs varient en fonction de la forme pharmaceutique ; elles sont comprises entre 0,9 et 10 µg/mL pour les comprimés. Après administration répétée à doses thérapeutiques, les taux plasmatiques varient entre 3 et 4 µg/mL.

■ *Métabolisme*

Le kétoconazole est métabolisé au niveau du foie (oxydation en métabolites inactifs) et il existe un phénomène de premier passage hépatique saturable. Il ne semble pas y avoir d'accumulation chez l'insuffisant hépatique.

■ *Excrétion*

Elle est essentiellement fécale. Seul 12 % du produit est éliminé dans les urines, dont 2 à 4 % sous forme active ; cette molécule n'est donc pas indiquée dans les candidoses urinaires et il n'est pas nécessaire d'ajuster la posologie chez l'insuffisant rénal.

e) Effets indésirables

Le kétoconazole est l'antifongique azolé le moins sélectif vis-à-vis des enzymes à cytochrome P-450 ; il peut provoquer :

- des atteintes hépatiques : augmentation asymptomatique des transaminases (5 à 10 %), plus rarement des hépatites immuno-allergiques cytolytiques voire cholestatiques, généralement modérées et réversibles à l'arrêt du traitement mais il faut savoir que des cas mortels ont été décrits au début de son utilisation. Dans les cas rapportés, les facteurs de gravité ont été le retard apporté au diagnostic de l'hépatopathie et à l'arrêt du traitement, ainsi que les traitements antérieurs par la griséofulvine ou par des médicaments hépatotoxiques. Le délai d'apparition est variable (de quelques jours à 24 semaines). Dans la très grande majorité des cas, les altérations hépatiques ont été modérées et ont disparu en moins de 2 mois après l'arrêt du médicament lorsque ce dernier a été interrompu rapidement ;
- des troubles digestifs, nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées, anorexie ;
- des troubles cutanés, rash, prurit, urticaire ;
- des troubles neurologiques, céphalées, vertiges, asthénie ;
- des troubles hématologiques, thrombopénies, leuconeutropénies ;
- plus rarement et à des doses supérieures à 400 mg/jour, des effets androgéniques : gynécomastie, oligospermie, impuissance, diminution de la libido, chute des cheveux, troubles menstruels ; et à dose thérapeutique (200 mg/j), diminution transitoire du taux de testostérone ;
- une augmentation de la pression intracrânienne réversible à l'arrêt du traitement (en particulier œdème papillaire, bombement de la fontanelle chez l'enfant).

f) Indications

Infections fongiques à germes sensibles :

- systémiques ou viscérales, le kétoconazole se révèle comme le traitement de choix dans les mycoses endémiques : blastomycoses, histoplasmose, paracoccidioïdomycose ;

- cutanéo-muqueuses, lorsque la thérapeutique locale est insuffisante (lésions étendues, résistantes aux traitements usuels), notamment muguet et œsophagites rebelles au cours du Sida ;
- prophylaxie des infections mycosiques chez l'immunodéprimé.

g) Posologie et mode d'administration

Le kétoconazole est administré par voie orale au cours d'un repas. La posologie moyenne est de 200 mg/jour ; elle peut être portée à 400 mg/jour lors des mycoses profondes graves, voire 800 mg/jour en 2 ou 3 prises pour les affections à champignons exotiques. Chez l'enfant, la posologie usuelle est de 4 à 7 mg/kg/j.

h) Contre-indications

Hypersensibilité aux azolés, insuffisance hépatique et antécédents d'hépatites.
En raison de la présence de lactose, ce médicament est contre-indiqué en cas de galactosémie congénitale, de syndrome de malabsorption du glucose et du galactose ou de déficit en lactase.

i) Grossesse et allaitement

Un effet tératogène a été mis en évidence chez l'animal. En conséquence, il est fortement déconseillé d'utiliser le kétoconazole en cours de grossesse. Chez les femmes en âge de procréer, il est indispensable de se soumettre à une contraception efficace.
Le kétoconazole passe dans le lait maternel, il est donc contre-indiqué d'allaiter pendant le traitement en raison du risque potentiel d'interaction chez l'enfant (torsade de pointe).

j) Précautions d'emploi

Étant donné le risque d'hépatotoxicité, il faut :

- avant tout début de traitement, réaliser un dosage des transaminases et rechercher des antécédents éventuellement aggravants (traitement antérieur par une substance hépatotoxique, hépatites…) ;
- informer le patient sur les symptômes annonciateurs d'atteinte hépatique (asthénie, prurit, ictère, urines foncées, selles décolorées, nausées, vomissements, douleurs abdominales), afin de permettre la prise en charge rapide d'une telle affection (arrêt du traitement, dosage des transaminases et des phosphatases alcalines) ;
- réaliser une surveillance biologique régulière de la fonction hépatique si le traitement excède 1 mois (ce qui correspond maintenant à une situation très rare).

Si le patient a présenté des réactions d'hypersensibilité au décours de l'administration topique de kétoconazole, il est recommandé de ne pas administrer cet azolé *per os*.
Le kétoconazole peut modifier l'activité des surrénales, il convient donc de surveiller cette fonction en cas d'insuffisance surrénalienne ou chez des patients soumis à des périodes de stress prolongées (chirurgie majeure, soins intensifs).

k) Interactions médicamenteuses

Les principales interactions médicamenteuses résultent de l'inhibition des enzymes à cytochrome P-450 hépatiques par le kétoconazole, entraînant alors une diminution du métabolisme de certains médicaments et une augmentation de leur toxicité ; on notera ainsi :

■ *Associations contre-indiquées*

- Risque accru de troubles de rythme ventriculaire (torsades de pointes) avec les antihistaminiques H1 non sédatifs (astémizole, terfénadine, ébastine), le bépridil, la mizolastine et la pimozide.
- Majoration des effets dépresseurs du système nerveux central du triazolam.
- Augmentation des effets indésirables dose-dépendants de type rhabdomyolyse avec les hypocholestérolémiants de la classe des inhibiteurs de l'HMGCo-A réductase : simvastatine, cérivastatine, atorvastatine.
- Augmentation de la toxicité du tacrolimus.
- Névirapine : augmentation des concentrations plasmatiques de la névirapine par diminution de son métabolisme hépatique par le kétoconazole, et diminution des concentrations plasmatiques du kétoconazole par augmentation de son métabolisme hépatique par la névirapine.

■ *Associations déconseillées*

- Alcool et médicaments contenant de l'alcool : effet antabuse chez les métaboliseurs lents.
- Risque majoré des troubles de rythme ventriculaire avec l'ébastine et l'halofantrine.
- Majoration des effets dépresseurs du système nerveux central du midazolam.
- Risque de surdosage en toltérodine chez les métabolismes lents.

■ *Associations nécessitant des précautions d'emploi*

- Avec la ciclosporine, il conviendra de renforcer la surveillance rénale et d'adapter la posologie en fonction de ses concentrations plasmatiques.
- Avec la méthylprednisolone par voie injectable, il faut accroître la surveillance clinique et éventuellement adapter la posologie.

Certains médicaments entraînant une augmentation du pH gastrique, diminuent l'absorption du kétoconazole :

- les sels, oxydes et hydroxydes de magnésium, aluminium et calcium sont à prendre à distance de l'antifongique (2 heures minimum) ;
- le didanosine (présence d'anti-acides dans la formulation) doit être administré 6 heures avant ou 2 heures après le kétoconazole.

Avec l'isoniazide et la rifampicine, il y a un phénomène d'induction enzymatique par les antituberculeux et de diminution de la résorption digestive par le kétoconazole : un délai de 12 heures entre les deux anti-infectieux est à respecter.

Lorsque le patient a antérieurement été traité par la griséofulvine ou par des médicaments hépatotoxiques, il est conseillé de respecter un intervalle d'un mois avant l'instauration d'un traitement par le kétoconazole.

Note : Chez l'enfant, on a noté une augmentation du risque de maladie veino-occlusive du foie en cas d'association avec de fortes posologies de busulfan.

e) Effets indésirables

Le fluconazole présente une très bonne tolérance par rapport aux autres triazolés, les effets indésirables les plus couramment rencontrés sont d'ordre digestifs et cutanés :

- troubles digestifs : nausées, vomissements, flatulences, douleurs abdominales, diarrhées ;
- effets cutanés : rashs, toxidermies bulleuses (syndrome de Stevens-Johnson, syndrome de Lyell surtout en cas de Sida).

On a également rapporté des cas d'alopécie généralement réversibles à l'arrêt du traitement, ainsi que des céphalées.

La toxicité hépatique est restreinte à une augmentation des enzymes hépatiques, en général réversible à l'arrêt du traitement. On peut également noter des atteintes hépatiques sévères, rares, et que l'on peut associer à des taux sériques élevés de fluconazole.

f) Indications

- Candidoses oropharyngées (COP) chez les patients immunodéprimés.
- Candidoses buccales atrophiques.
- Candidoses systémiques incluant les candidoses invasives profondes (candidémies, péritonites), les candidoses œsophagiennes et les candidoses urinaires ; dans ces indications, *Candida albicans* représente la majorité des espèces isolées dans les études cliniques, l'efficacité n'est pas établie dans les infections dues à d'autres espèces de *Candida*, notamment *Candida glabrata* et *Candida krusei* (espèces habituellement résistantes). Il faut également noter que chez le patient neutropénique, l'efficacité du fluconazole n'est pas établie, de même, pour les formes graves, son efficacité par rapport à l'amphotéricine B n'est pas connue.
- Prévention des infections à *Candida* sensibles chez l'adulte présentant une neutropénie sévère et prolongée lors du traitement d'induction ou de consolidation des leucémies aiguës, et subissant une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.
- Cryptococcoses neuroméningées.
  Efficacité démontrée dans le traitement d'attaque, principalement chez les patients atteints du Sida. Pour les autres types d'immunodépression (transplantations d'organes, hémopathies), chez les patients immunocompétents et pour les formes graves, l'amphotéricine B associée à la 5FC lui sera préférée (l'amphotéricine B paraît stériliser le LCR plus rapidement).
- Thérapeutique de choix dans la prophylaxie des récidives chez le patient sidéen ; la prescription sera dans ce cas poursuivie indéfiniment.

L'efficacité du fluconazole dans d'autres localisations cryptococciques pulmonaires ou cutanées, ainsi que son intérêt par rapport à l'amphotéricine B chez le sujet immunocompétent, ne sont pas établis.

Le fluconazole peut également s'avérer utile dans la prophylaxie d'infections à *Candida* chez le patient à risque, dans la prise en charge d'une fièvre résistante aux antibiotiques chez le patient neutropénique ou dans le traitement de certaines mycoses endémiques : histoplasmoses, coccidioïdomycoses et paracoccidioïdomycoses.

■ *Biostransformation*

L'itraconazole est métabolisé au niveau hépatique par le cytochrome 3A4 en métabolite actif, l'hydroxyitraconazole. Ce dernier possède une activité antifongique comparable à l'itraconazole.

■ *Distribution*

La liaison aux protéines plasmatiques est très élevée (supérieure à 99 %) ; de ce fait, la concentration d'itraconazole est faible dans les liquides pauvres en protéines (salive, urine, LCR, humeur aqueuse). Cependant, son affinité tissulaire lui permet d'atteindre des concentrations importantes dans presque tous les tissus, notamment au niveau vaginal, pulmonaire, musculaire, osseux, cutané, rénal, hépatique et splénique, dues à un volume de distribution élevé (700 L).
L'accroissement des concentrations plasmatiques est supérieur à celui des quantités administrées ; cela traduit un phénomène de saturation de l'effet de premier passage hépatique.

■ *Élimination*

Essentiellement sous forme métabolisée (métabolite inactif) dans les fèces (50 %) et les urines (35 %). La proportion de produit non métabolisé retrouvée dans les urines est très faible. La demi-vie d'élimination est de 20 heures après une prise unique (30 heures en traitement chronique) pour les formes orales, et de 33 heures pour la forme injectable. L'élimination de l'itraconazole à partir des tissus est lente (2 à 4 semaines après arrêt d'un traitement de 4 semaines au niveau de la peau et au niveau de la kératine des ongles, la molécule persiste au moins 6 mois après la fin d'un traitement de 3 mois).
Les caractéristiques pharmacocinétiques de l'itraconazole ne sont pas modifiées chez l'insuffisant rénal mais son métabolisme hépatique est sensiblement réduit en cas d'altération de la fonction hépatique.

e) Effets indésirables

Les effets indésirables les plus fréquents sont des troubles gastro-intestinaux, des céphalées et des vertiges.
Une augmentation réversible des enzymes hépatiques, des réactions allergiques, des neuropathies périphériques et des troubles menstruels ont été plus rarement rapportés.
Au cours des traitements prolongés, plus particulièrement chez des patients ayant une pathologie grave sous-jacente et recevant une polymédication, des cas d'hypokaliémie, d'œdèmes, d'hépatites et de chute de cheveux ont été rapportés. Une surveillance régulière de la fonction hépatique est donc recommandée pour tout traitement d'une durée supérieure à un mois.

f) Indications

L'itraconazole est essentiellement un anti-aspergillaire. Il y a peu d'indications dans le traitement des infections à levure, cependant certaines sont en cours d'étude et des extensions sont envisageables.

■ *Itraconazole gélule*

- Kératites fongiques notamment à *Aspergillus*.
- Mycoses systémiques ou viscérales à *Aspergillus* et champignons dimorphiques : aspergillomes non opérables, aspergillose broncho-pulmonaire et pulmonaire nécrosante, y compris chez l'immunodéprimé, aspergillose invasive de l'immunodéprimé en relais de l'amphotéricine B, chromomycose, histoplasmose, paracoccidioïdomycose, sporotrichose et autres mycoses rares.
- Dermatophyties cutanées : lorsque ces infections ne peuvent être traitées localement du fait de l'étendue des lésions ou de la résistance aux traitements antifongiques habituels.

Note : l'itraconazole peut être utilisé en prophylaxie secondaire de l'aspergillose (pas de protocole précis), éventuellement en prophylaxie primaire de l'aspergillose chez le patient immunodéprimé (intérêt non démontré).

■ *Itraconazole solution buvable*

Une seule indication : traitement des candidoses orales et/ou œsophagiennes chez les patients infectés par le VIH.

Cependant, son utilisation hors AMM peut être une alternative à la forme gélule chez les patients qui ne s'alimentent pas.

■ *Itraconazole solution injectable*

Le traitement présomptif des infections fongiques présumées chez le neutropénique, la cryptoccocose, les candidoses systémiques et/ou disséminées, constituent des utilisations possibles de cette formulation mais ne sont pas encore bien évaluées.

g) Posologie et mode d'administration

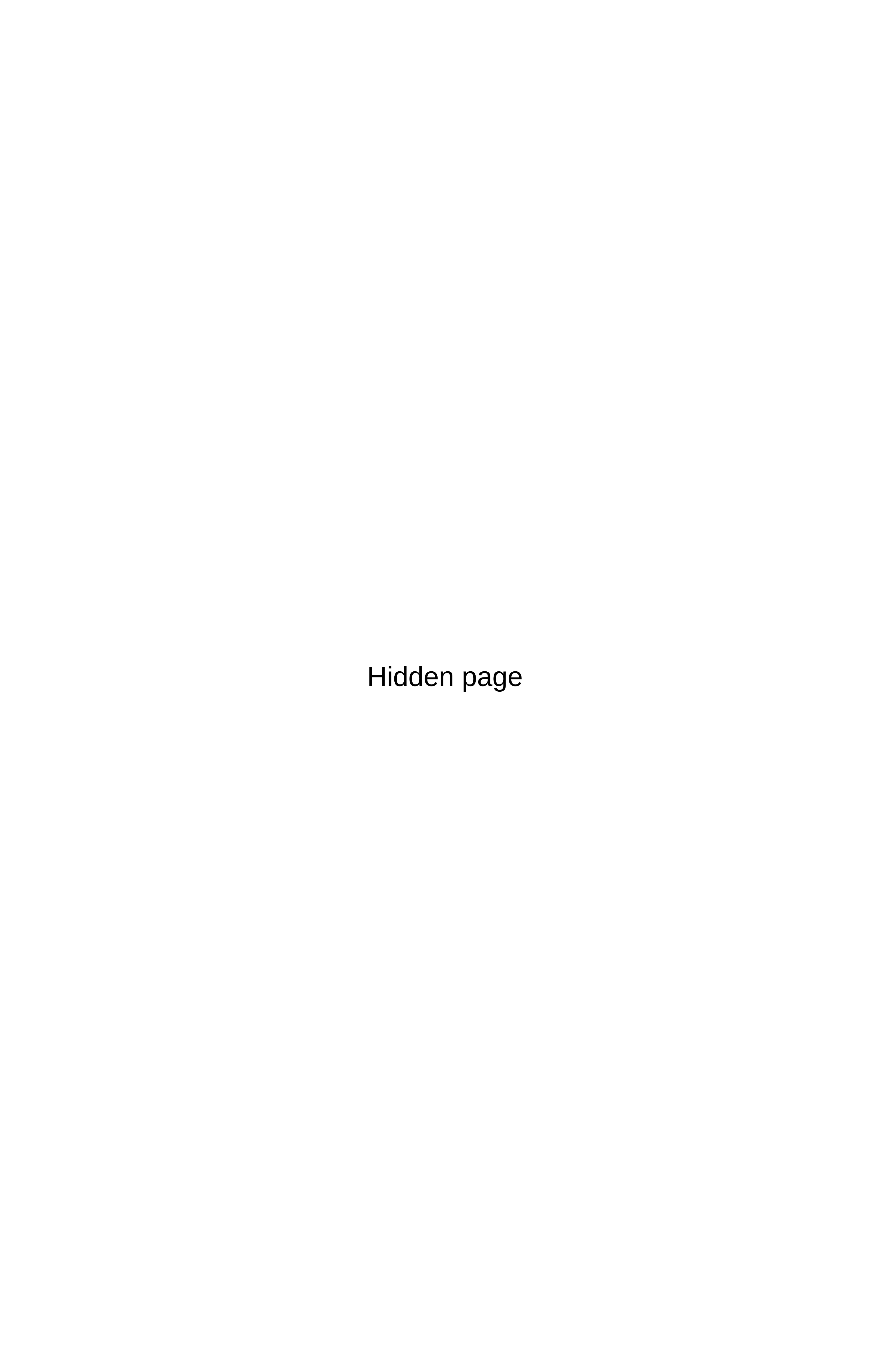
■ *Itraconazole gélule*

La posologie usuelle est de 200 mg (pour les mycoses superficielles) à 400 mg (pour les mycoses systémiques ou viscérales) par jour, de préférence en une seule prise, immédiatement après un repas. Les posologies les plus fortes sont recommandées chez l'immunodéprimé (biodisponibilité réduite). Les gélules ne doivent pas être ouvertes et l'administration avec une boisson contenant du cola est préconisée chez les patients présentant une achlorhydrie (sidéens, traitements par antiacides).

■ *Itraconazole solution buvable*

- Candidose oropharyngée : 200 mg/jourde préférence en deux prises pendant 1 à 2 semaines en fonction de l'évolution clinique ou éventuellement en 1 prise pendant 1 semaine à poursuivre pendant une semaine si la réponse n'est pas satisfaisante.
- Candidose oropharyngée résistante au fluconazole : 100 à 200 mg deux fois par jour pendant 2 semaines, à poursuivre pendant 2 semaines supplémentaires si la réponse au traitement n'est pas satisfaisante.

L'administration doit se faire en dehors des repas, la solution doit être laissée en contact avec la bouche pendant environ 20 secondes, puis avalée ; il faut éviter de


Hidden page

j) Grossesse et allaitement

Chez l'animal, un effet tératogène a été mis en évidence. Chez la femme en âge de procréer, une contraception efficace est nécessaire pendant toute la durée du traitement. L'initiation d'un traitement par l'itraconazole chez la femme enceinte ne doit se faire que si le bénéfice attendu est supérieur au risque encouru. Dans ce cas, cela ne constitue pas un élément systématique d'interruption de grossesse, mais une surveillance orientée doit être mise en place.
L'allaitement est déconseillé.

k) Interactions médicamenteuses

Elles sont nombreuses.

■ *Diminution du métabolisme des médicaments associés à l'itraconazole*

Contre indications :
- le triazolam : majoration des effets dépresseurs du système nerveux central uniquement pour la forme IV ;
- le bépridil, l'halofantrine, la mizolastine, la pimozide, le sertindole et le cisapride sous sa forme pédiatrique : risque majoré des troubles du rythme ventriculaire, notamment de torsades de pointe ;
- les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (simvastatine, atorvastatine) : risque accru des effets indésirables type rhabdomyolyse. Il est conseillé d'interrompre le traitement hypocholestérolémiant pendant la durée du traitement par itraconazole. Si cette option est non réalisable, l'association des 2 médicaments se fera sous surveillance clinique et biologique étroite en adaptant la posologie des statines ;
- le vardénafil pour les formes orales : chez l'homme de plus de 75 ans, risque d'hypotension sévère.

Médicaments déconseillés :
- la buspirone, le midazolam : majoration importante de la sédation ;
- l'ébastine, la luméfantrine, l'artéméther et la quinidine : risque majoré de troubles du rythme ventriculaire notamment des torsades de pointes. Si cela est possible, il est nécessaire d'interrompre le torsadogène, sinon un contrôle préalable de l'onde QT et une surveillance de l'ECG monitorée sont conseillés ;
- la quinidine : risque d'acouphènes et de diminution de l'acuité auditive (cinchonisme). Une surveillance clinique étroite est donc nécessaire ;
- lercanidipine : risque d'oedèmes ;
- le tacrolimus : altération de la fonction rénale. Un contrôle strict de la fonction rénale, le dosage des concentrations en tacrolimus et une adaptation éventuelle de la posologie sont conseillés ;
- les vinca-alcaloïdes cytotoxiques : majoration de la neurotoxicité ;
- la toltérodine : risque de surdosage.

Associations nécessitant des précautions d'emploi :
- anticoagulants oraux : augmentation de l'effet anticoagulant oral et du risque hémorragique. Un contrôle fréquent de l'INR et une adaptation posologique de l'anticoagulant s'imposent ;
- la buprénorphine ;

- le budésonide et la fluticasone (uniquement pour la forme IV) : risque d'apparition d'un syndrome cushingoïde ;
- la digoxine ;
- la ciclosporine ;
- la dihydropyridine.

Ces associations doivent conduire à un renforcement de la surveillance clinique et/ou biologique ainsi qu'à une diminution éventuelle de la posologie du médicament associé à l'itraconazole.

■ *Augmentation du métabolisme de l'itraconazole par des médicaments inducteurs enzymatiques*

L'association avec la phénytoïne est déconseillée car cet anticonvulsivant est capable de rendre inefficace la thérapeutique antifongique. En revanche, avec la carbamazépine, le phénobarbital et la primidone, l'utilisation concomitante de l'itraconazole est possible ; dans ce cas, la posologie de l'azolé sera éventuellement adaptée en fonction de ses taux plasmatiques.
L'administration d'itraconazole se fera à distance de celle de la rifampicine car la rifampicine augmente le métabolisme de l'antifongique et l'itraconazole diminue l'absorption de l'antituberculeux.

■ *Diminution de l'absorption de l'itraconazole par augmentation du pH gastrique*

Il s'agit de précautions d'emploi qui ne concernent que la forme gélule de l'antifongique :
- avec les inhibiteurs de la pompe à protons et les antihistaminiques H2, ou chez des patients présentant une achlorhydrie, il est recommandé de l'administrer avec une boisson contenant du cola ;
- avec la didanosine (présence d'un antiacide dans la formulation) : prendre l'itraconazole 2 heures avant ou 6 heures après l'antiviral.

5. Voriconazole

Le voriconazole est un triazolé de deuxième génération, développé dans le but d'élargir le spectre d'activité du fluconazole dont c'est un proche dérivé sur le plan structural.

a) Structure

Figure 10. Le voriconazole

b) Spécialités :

VFend : comprimés à 50 et 200 mg, (liste I).
VFend : poudre pour solution pour perfusion de 200 mg, (liste I).
VFend : poudre pour suspension buvable à 40 mg/mL, (liste I).

c) Pharmacologie

■ *Mécanisme d'action*

Il est identique à celui des autres azolés, par inhibition de la 14-α-déméthylase enzyme cytochrome P450 dépendante, responsable de la transformation du lanostérol en ergostérol. Par rapport au fluconazole, l'adjonction d'un groupement méthyl sur la chaîne propanol, de même que le remplacement d'un cycle triazole par un cycle pyrimidine fluoré en C5, sont autant de facteurs qui augmentent l'activité inhibitrice sur l'enzyme-cible. De plus, à la différence du fluconazole, cet antifongique interagit aussi avec la 24-méthylène dihydrolanostérol déméthylase de certaines levures et de certains champignons filamenteux.
Globalement, l'activité *in vitro* et *in vivo* du voriconazole est supérieure à celle du fluconazole, et se caractérise par un spectre élargi aux champignons filamenteux, en particulier *Aspergillus fumigatus* (activité fongicide).

■ *Spectre*

Le voriconazole est très actif sur les genres *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* ainsi que sur *Cryptococcus neoformans*, *Scedosporium prolificans* et les champignons responsables de mycoses endémiques.
Il existe un risque de résistance croisée avec les autres azolés ; cependant, dans la majorité des cas, l'augmentation correspondante des concentrations minimales inhibitrices du voriconazole n'est pas suffisante pour entraîner une perte d'efficacité.

d) Pharmacocinétique

■ *Résorption*

La biodisponibilité *per os* est excellente (96 % avec une absorption rapide et presque complète) mais diminuée par la prise d'aliments. Le pic plasmatique est atteint en 1 ou 2 heures.

■ *Distribution*

Le voriconazole est modérément lié aux protéines plasmatiques (51 à 67 %) ; il diffuse largement et des concentrations intéressantes sont obtenues dans le LCR et la salive. Le Vd = 4,6 L/kg.

■ *Métabolisme*

Intense, par les isoenzymes du cytochrome P450, en particulier les cytochromes 2C9 et 2C19 et à un moindre degré le cytochrome 3A4 avec inhibition compétitive de ces isoenzymes par le voriconazole. L'isoenzyme 2C19 est caractérisée par son polymorphisme génétique : la prévalence des métaboliseurs lents est de 15 à 20 % dans la population asiatique, et de 3 à 5 % dans les populations caucasiennes et noires. Il y a un phénomène de premier passage hépatique saturable.

■ *Excrétion*

Elle est essentiellement urinaire, après métabolisation hépatique (moins de 2 % de la dose est retrouvée sous forme inchangée dans les urines). Le principal métabolite est le N-oxyde-voriconazole présentant une activité antifongique minime (100 fois moins que celle du voriconazole). La demi-vie d'élimination dépend de la dose administrée, elle est d'environ 6 heures pour une dose de 200 mg par VO.
D'autre part, le voriconazole présente un profil pharmacocinétique non linéaire dû à une saturation de son métabolisme, que ce soit par VO ou IV, cela implique donc que la demi-vie d'élimination ne permet pas de prévoir l'accumulation ou l'élimination du voriconazole.
L'atteinte de l'état d'équilibre nécessite environ 6 jours, il est donc recommandé d'administrer une dose de charge de 6 mg/kg 2 fois/jour (IV) ou de 400 mg 2 fois/jour (VO) les 24 premières heures.

e) Effets indésirables

Il est décrit des troubles de la vision, de l'ordre de la photophobie, du changement de la perception des couleurs (troubles transitoires, généralement réversibles à l'arrêt du traitement). On note également des éruptions cutanées, avec de rares cas d'érythrodermie bulleuse ou d'érythème polymorphe et une photosensibilité. On peut aussi retrouver une augmentation des enzymes hépatiques ainsi que des réactions liées à la perfusion (fièvre, sueurs, tachycardie, prurit et rash).

f) Indications

- Traitement des aspergilloses invasives.
- Traitement des infections invasives graves à *Candida* (y compris *C. krusei*) résistant au fluconazole (absence de résistance croisée) mais attention pour *C. glabrata*.
- Traitement des infections fongiques graves à *Scedosporium spp* ou *Fusarium spp*.
- Traitement des candidémies chez les patients non neutropéniques.
- Administration possible en première intention chez les patients immunodéprimés atteints d'infections évolutives pouvant menacer le pronostic vital.

g) Posologies et mode d'administration

Les comprimés doivent être pris en dehors des repas (une heure avant ou après) ; pour la perfusion, elle sera administrée en 1 ou 2 heures avec un débit maximal de 3 mg/kg/h.

- Dose de charge (les 24 premières heures) : 6 mg/kg toutes les 12 heures (IV), 400 mg toutes les 12 heures (poids > 40 kg) et 200 mg toutes les 12 heures (poids < 40 kg) pour la VO.
- Dose d'entretien : 4 mg/kg 2 fois/jour (IV), 200 mg 2 fois/jour (poids > 40 kg) et 100 mg 2 fois/jour (poids < 40 kg) pour la VO.

Une adaptation posologique est possible selon l'efficacité et la tolérance au traitement.

■ *Métabolisme*

On ne connaît aucun métabolite principal au posaconazole, on retrouve quelques métabolites glycuruno-conjugués.

■ *Excrétion*

Elle est lente avec une demi-vie moyenne de 35 heures. La voie principale étant l'élimination par les fèces (77 % de la dose dont 66 % n'a pas été métabolisé), l'excrétion urinaire est mineure (14 % de la dose).

e) Effets indésirables

Les plus fréquemment retrouvés étant : nausées (20 à 29 %), céphalées (26 %), fièvre, allongement du QTc, vomissements, altération du goût, flatulence, bouche sèche, anorexie, insomnie, bouffées de chaleur, peau sèche, prurit, rash et neutropénie, augmentation des transaminases.

f) Indications

Le posaconazole est indiqué dans le traitement des infections fongiques invasives telles que :

- aspergillose invasive chez les patients réfractaires à l'amphotéricine B ou à l'itraconazole, ou chez des patients intolérants à ces médicaments ;
- fusariose chez des patients réfractaires ou intolérants à l'amphotéricine B ;
- mycoses endémiques (très rares en France) ;
- chromoblastomycose et mycétome chez les patients réfractaires ou intolérants à l'itraconazole ;
- coccidioïdomycose chez les patients réfractaires ou intolérants à l'amphotéricine B, à l'itraconazole ou au fluconazole.

Le caractère réfractaire est défini par une progression de l'infection ou une absence d'amélioration après un minimum de 7 jours de traitement avec un antifongique théoriquement efficace et aux doses thérapeutiques.

g) Posologie

La posologie usuelle est de 400 mg (soit 10 mL) deux fois par jour accompagnée d'un repas ou d'un complément nutritionnel (240 mL). En cas d'intolérance au repas, la dose journalière sera fractionnée en 4 prises de 200 mg.
En cas d'insuffisance rénale, il n'est pas recommandé d'adapter la posologie ; c'est le cas également pour l'insuffisance hépatique du fait de l'absence d'étude.

h) Contre-indications

Hypersensibilité connue à l'un des composants.
Le posaconazole étant un inducteur enzymatique, certaines associations sont contre-indiquées, notamment avec les substrats du cytochrome 3A4 comme la terfénadine, l'astémizole, le cisapride, le pimozide, l'halofantrine et la quinidine (risque d'accumulation avec augmentation de l'intervalle QT et donc de torsade de pointes).
On peut noter également l'association aux inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (simvastatine, lovastatine et atorvastatine).

g) Posologie et mode d'administration

La posologie usuelle est de 250 mg/jour, de préférence au cours d'un repas. La durée de traitement est fonction de la lésion :
- onychomycoses de la main : 6 semaines à 3 mois ;
- onychomycoses des pieds : 3 à 6 mois ;
- dematophyties de la peau glabre, candidoses cutanées : 2 à 4 semaines ;
- intertrigos interdigito-plantaires, kératodermies palmo-plantaires : 2 à 6 semaines.

Note : l'activité fongicide et la diffusion à travers toute la tablette unguéale de la terbinafine permettent d'expliquer la réduction notable de la durée du traitement par rapport aux autres antifongiques utilisés pour les mêmes indications.

h) Contre-indications

- Hypersensibilité connue à la terbinafine.
- Insuffisance hépatique sévère.
- Insuffisance rénale sévère.

i) Précautions d'emploi

En cas d'altération modérée des fonctions hépatiques ou rénales, le traitement sera débuté à une posologie plus faible. Devant tout symptôme pouvant faire suspecter une atteinte hépatique en cours de thérapeutique, il est nécessaire d'effectuer un bilan hépatique et d'interrompre le traitement si les anomalies sont importantes.
Les données sont insuffisantes pour pouvoir conseiller la terbinafine chez l'enfant.

j) Grossesse et allaitement

Bien qu'il n'y ait pas d'effet tératogène chez l'animal, on évitera l'utilisation de la terbinafine pendant la grossesse.
La terbinafine passe dans le lait maternel, par mesure de précaution pour l'enfant, il est déconseillé d'allaiter.

k) Interactions médicamenteuses

Des précautions d'emploi sont nécessaires avec les médicaments inhibiteurs ou inducteurs enzymatiques ; à ce titre, on peut citer la rifampicine qui accélère la clairance plasmatique de l'antifongique.

D. Échinocandines

Cette nouvelle classe d'antifongiques, d'utilisation clinique récente, représente une alternative possible face à la recrudescence des infections mycosiques sévères posant des problèmes de résistance ou d'intolérance aux traitements conventionnels. Le chef de file de cette nouvelle classe est la caspofungine ou Cancidas®. Deux autres représentants sont actuellement en phase III, il s'agit de la micafungine et de l'anidulafungine.

1. Caspofungine

La caspofungine est un antimycosique à usage systémique, disponible uniquement par voie IV.

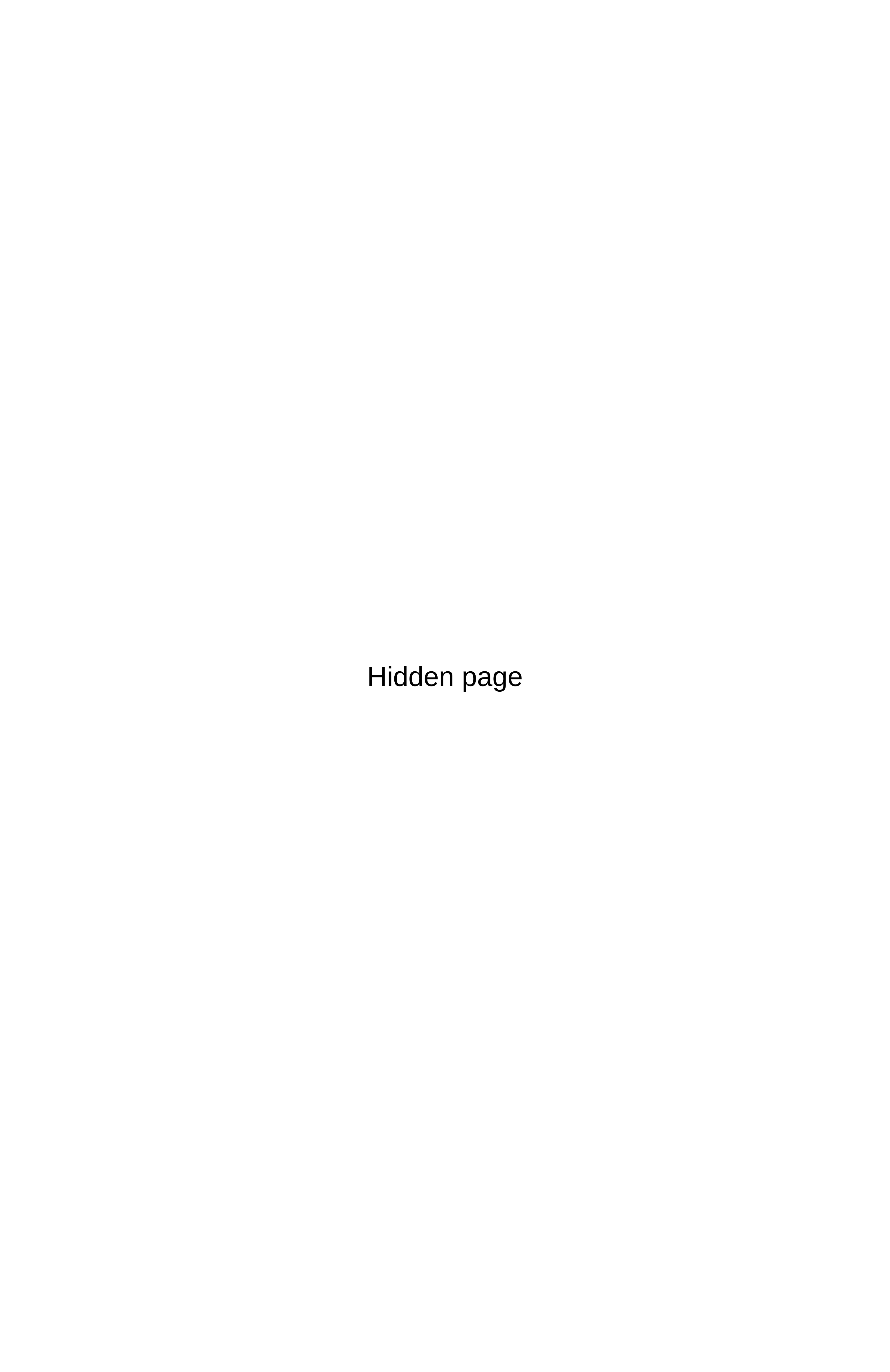

Hidden page

Tableau 2. Principales caractéristiques des antifongiques systémiques

	Griséofulvine	Amphotéricine B	5-Fluorocytosine	Azolés					Terbinafine	Caspofongine
				Kétoconazole	Fluconazole	Itraconazole	Posaconazole	Voriconazole		
Résorption	Variable (↗ par les corps gras)	Très faible	Très bonne	Bonne (repas, pH)	Très bonne	Bonne (repas, pH pour la forme gélule)	Lente, augmentée par les aliments riches en graisses	Très bonne, diminuée par l'alimentation	Bonne	
Fixation protéique	Élevée (80 %)	Élevée (95 %)	Faible	Élevée (84 %)	Faible	Très forte (99 %)	Forte (> 98 %)	Modérée (51-67 %)	Élevée (> 90 %)	Élevée (≅ 97 %)
Diffusion	Peau, phanères	Élevée dans foie, rate, rein, poumon et peu dans le LCR *Ampho B liposomale : C° max dans foie et rate et faible dans le rein.* *Ampho B lip complexe : C° max dans foie, rate et poumon et faible au niveau rénal*	Excellente notamment dans le LCR. Bonne dans les os, les secrétions bronchiques et la bile	Correcte (sauf LCR)	Bonne notamment dans le LCR, la salive et les secrétions bronchiques	Bonne dans presque tous les tissus	Grande distribution tissulaire (V_D = 1 744 L)	Bonne notamment dans la salive et le LCR	Bonne diffusion tissulaire notamment au niveau de la peau, des ongles et des cheveux	Bonne (tous tissus ?)
Métabolisme	Hépatique	Non	Négligeable	Hépatique important	Faible	Hépatique important	Faible, pas de métabolite principal	Hépatique important	Hépatique +++	Hépatique
Excrétion	Biliaire (non métabolisé) +++, rénale (métabolites)	1/3 urinaire 2/3 biliaire	Urinaire sous forme inchangée	Biliaire	Urinaire sous forme inchangée	Biliaire (50 %) et urinaire (35 %)	Lente, élimination principale par les fèces (77 %) et excrétion urinaire faible (14 %)	++ isoenzymes 2C9 et 2C19 Urinaire sous forme de métabolites	Urinaire sous forme de métabolites	Urines (41 %) et fèces (35 %)
Mode d'action	Inhibition de la synthèse de la paroi fongique. Activité antimitotique	– *Effets membranaires* Altération de la perméabilité membranaire par formation de complexes insolubles avec les stérols la constituant – *Effets complexes métaboliques*	Antimétabolite de la cytosine, inhibition de la synthèse protéique + Inhibition de la thymidylate synthétase, formation d'ADN bloquée	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol : mauvaise sélectivité sur les enzymes à cyt P450 fongiques	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol : grande spécificité sur les enzymes à cyt P450 fongiques	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol : bonne spécificité sur les enzymes à cyt P450 fongiques	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol : bonne spécificité sur les enzymes à cytochrome P450 fongiques	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol : bonne spécificité sur les enzymes à cyt P450 fongiques	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol au niveau de la squalène époxydase	Inhibition de la synthèse des polysaccharides essentiels de la paroi fongique au niveau de la 1,3-β- D-glucane synthétase

.../...

Les antipaludiques

P. CHAVATTE, D. LESIEUR,
Laboratoire de chimie thérapeutique,
faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques, Lille.

facilement accessibles par synthèse et possédant cette disposition font l'objet d'études qui conduisent au proguanil. Les recherches menées à partir de la pyrimidine révèlent l'intérêt des 2,4-diamino pyrimidines et se traduisent par l'avènement de la pyriméthamine, puis de la triméthoprime.
Le mode d'action de ces produits faisant intervenir l'inhibition de la dihydrofolate réductase, ils sont surtout utilisés en association avec les sulfamides antibactériens (sulfadoxine : Fansidar®), la chloroquine (Savarine®) ou l'atovaquone (Malarone®), ce qui se traduit par une potentialisation de l'action antipaludique et une activité sur les souches résistantes.

C. Recherches à partir du Qinghaosu

L'activité antipaludique du qinghao (*Artemisia annua L*) est connue en Chine depuis de très nombreuses années. Le principe actif de cette variété d'armoise, l'artémisinine, est une lactone terpénique peu maniable en thérapeutique. Des modifications structurales apportées à ce composé ont conduit à des dérivés tels que l'artéméther, l'artésunate et l'artéflène, dont certains sont déjà utilisés en traitement curatif dans les zones de multirésistance (groupe III).

II. Classification

Elle est basée sur leur point d'impact au niveau du cycle parasitaire.

A. Schizonticides sanguins

Ils agissent sur les formes endo-érythrocytaires asexuées (trophozoïtes et schizontes) qui sont responsables des signes cliniques de la maladie. Ils se répartissent en 2 groupes selon leur activité et leur capacité à engendrer les résistances. Il n'existe cependant pas de résistance croisée entre les 2 groupes.
- Action **rapide** : résistance variable selon les pays : quinine, 4-amino quinoléines, méfloquine, halofantrine, luméfantrine et dérivés de l'artémisinine ;
- Action **lente** : résistance apparaissant rapidement :
  - antifoliniques : 2,4-diamino pyrimidines, biguanides ;
  - antifoliques : sulfamides, sulfones.

Il convient de noter que certains antibiotiques appartenant à la famille des tétracyclines (doxycycline) ou des macrolides (érythromycine) sont utilisés seuls ou en association avec les schizonticides dans les zones de multirésistance.

B. Schizonticides tissulaires

Ils agissent sur les formes exo-érythrocytaires asexuées (hypnozoïtes et schizontes) et sont utilisés en prophylaxie, lors des cures radicales ou dans la prévention des rechutes à long terme des infections à *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale*.

Tableau 1. Antipaludiques utilisés en thérapeutique

DCI	Dénominations commerciales	Forme Pharmaceutique	Dosages* (mg)
Quinine (sels de)	Quinine chlorhydrate Lafran® Quinimax® (chlorhydrate) Quinimax® (gluconate) Surquina® (chlorhydrate)	Comprimés Comprimés Ampoules Comprimés	224,75 (250) - 449,5 (500) 120 (125) - 480 (500) 120 (125) - 240 (250) - 480 (500) 250 (305,85)
Méfloquine	Lariam® (chlorhydrate)	Comprimés	250 (274,1)
Halofantrine	Halfan® (chlorhydrate)	Comprimés Suspension buvable	233 (250) 18,64/ml (20/ml)
Arthéméther + Luméfantrine	Riamet®	Comprimés	20 + 120
Chloroquine	Nivaquine® (sulfate)	Comprimés Sirop Ampoules	100 (130) - 300 (390,1) 5/ml (6,81/ml) 100 (130)
Amodiaquine	Flavoquine® (chlorhydrate)	Comprimés	153 (200)
Proguanil	Paludrine® (chlorhydrate)	Comprimés	87,5 (100)
Proguanil (chlorhydrate) + Chloroquine (phosphate)	Savarine®	Comprimés	175 (200) + 100 (161,2)
Proguanil (chlorhydrate) + Atovaquone	Malarone®	Comprimés	87,5 (100) - 21,9 (25) + 250 - 62,5
Pyriméthamine	Malocide®	Comprimés	50
Sulfadoxine + Pyriméthamine	Fansidar®	Comprimés Ampoules	500 + 25
Doxycycline	Doxy®, Doxygram®, Doxylis®, Doxypalu®, Granudoxy®, Spanor®, Tolexine®, Vibramycine N®	Comprimés	50 -100
Primaquine	Non disponible en France Primaquine® (phosphate)	Comprimés	7,5 (13,2) - 15 (26,3)
Artéméther	Non disponible en France Paluther®, Arténam®	Comprimés Ampoules	50 40 à 80

Les dosages sont exprimés en base et en sel. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux dosages exprimés en sel

III. Schizonticides

A. Schizonticides d'action rapide

1. Mode d'action

Ils ont fait l'objet de nombreux travaux, surtout avec la chloroquine. Les faits suivants semblent maintenant acquis :

- ces médicaments se concentrent préférentiellement dans l'hématie parasitée ;
- ils ciblent la vacuole digestive du parasite.

Les enzymes présentes dans la vacuole digestive du *Plasmodium* permettent la dégradation de l'hémoglobine en acides aminés d'une part et en ferriprotoporphy-

■ *Pharmacocinétique*

Résorption : par voie orale elle est rapide et presque totale (90 %) mais souvent diminuée chez les paludéens graves d'où la nécessité d'utiliser la voie parentérale (même en l'absence de troubles digestifs).
Distribution : pic plasmatique obtenu en 2 ou 3 heures. Le taux chute rapidement et devient nul au bout de 24 heures. La demi-vie d'élimination est très variable selon qu'il s'agit de sujets *apyrétiques* (11 heures), de sujets ayant un accès palustre simple (16 heures) ou un accès pernicieux (18 heures). La concentration dans les hématies est le 1/5 du taux plasmatique. Le passage transplacentaire et dans le lait est faible.
Métabolisme : hépatique rapide en métabolites inactifs. Le dérivé hydroxylé en position 2 du cycle quinoléique est le métabolite principal.
Élimination : urinaire rapide des métabolites hydroxylés (dont l'hydroxyquinine) et de quinine (20 % de la dose administrée). La quinine apparaît dans les urines 1 à 2 heures après injection. Cette élimination cesse à la 24e heure. Une petite partie est éliminée dans la bile et les fèces.

■ *Indications – Posologie*

La quinine est un schizonticide sanguin majeur non dépourvu d'inconvénients :
- c'est un produit d'extraction, sa production reste tributaire de l'approvisionnement en matière première ;
- sa pharmacocinétique pose des problèmes d'observance ;
- elle présente de nombreux effets indésirables.

C'est la raison pour laquelle elle est utilisée uniquement dans le traitement de certains cas de paludisme à *Plasmodium falciparum*.

Traitement des accès pernicieux

Il est en général réalisé en unité de soins intensifs. On administre un sel de quinine, en perfusion dans du sérum glucosé, à la dose de 8 mg de base par kg. La perfusion de 3 à 4 heures est répétée toutes les 8 heures pendant 7 jours au minimum.
Il est parfois utile de surveiller la quininémie (taux moyen : 5 à 7 mg/L), notamment en cas d'échec thérapeutique ou d'effets secondaires importants.
Au besoin, on associe de la doxycycline ou de l'érythromycine.
Après amélioration, on peut instaurer un traitement relais par voie orale.
Dans certains cas particulièrement graves tels que coma ou parasitémie élevée, certains auteurs ont récemment proposé une exsanguino-transfusion.

Traitement des cas résistant aux dérivés de synthèse

On administre un sel de quinine par voie orale ou parentérale à la dose de 25 mg/kg/24 h en 3 prises pendant 7 à 10 jours. Ici encore, on peut éventuellement associer une cycline ou un macrolide.

■ *Précautions d'emploi*

- Surveiller la quininémie dans certains cas (*cf. supra*) ;
- Surveiller la glycémie, l'ECG et, en cas de traitement prolongé, la fonction auditive ;
- En cas d'insuffisance rénale, diminuer la posologie de moitié à partir de la seconde perfusion ;
- Respecter rigoureusement les mesures d'asepsie pour les formes injectables.

■ *Effets indésirables*

Ils sont nombreux et certains d'entre eux font de la quinine un produit difficile à manier.

Effets locaux

- Par voie orale, la quinine provoque une irritation de la muqueuse gastrique avec gastralgies, nausées, vomissements ;
- Par voie intraveineuse et en cas de solution insuffisamment diluée, elle risque d'induire une endophlébite inflammatoire et sclérosante. Il est donc nécessaire de l'utiliser en perfusion dans du sérum glucosé ;
- Par voie intramusculaire, elle est très mal tolérée et provoque douleur, réaction inflammatoire, lésions nécrotiques pouvant se surinfecter. Cette voie est à éviter dans la mesure du possible ;
- La voie sous-cutanée est très mal tolérée, donc à éviter.

Effets généraux

- **Accident classique** : *cinchonisme*. Il se manifeste en cas de posologie importante. Il se traduit surtout par une atteinte de la 8e paire de nerfs crâniens avec hypoacousie, vertiges, bourdonnements d'oreilles (dans 2/3 cas) réversibles par diminution de la posologie.
  - Au niveau cardio-vasculaire, on constate une hypotension voire collapsus par vasodilatation (quand la dose est forte mais aussi quand la perfusion est trop rapide). Diminution de l'excitabilité, de la conductibilité et de la contractilité du myocarde ;
  - Troubles de la vue : photophobie, diminution de l'acuité visuelle ;
  - Troubles digestifs résultant des effets locaux (*cf. supra*).

Ces incidents régressent entre 4 et 8 heures après l'arrêt du traitement.

- **Autres accidents** (plus rares et traduisant une hypersensibilité donc survenant à doses faibles) :
  - éruptions cutanées, fièvre, prurit ;
  - thrombopénie, anémie hémolytique si déficit en G6PD ;
  - fièvre bilieuse hémoglobinurique (= grande hémolyse intravasculaire).
- **Au niveau musculaire :**
  - fibres lisses : stimulation des contractions utérines pendant le travail sans que cette action puisse déclencher un accouchement prématuré ;
  - sur le muscle strié, la quinine possède un effet curarisant et antitétanique : elle diminue l'excitabilité de la plaque motrice et augmente la période réfractaire ;
  - la quinine est proposée sous forme de benzoate (Hexaquine®) dans le traitement d'appoint des crampes musculaires.

La quinine peut en revanche aggraver la myasthénie qui constitue une contre-indication. *La quinine n'est pas tératogène aux doses thérapeutiques.*

À signaler *le risque d'hypoglycémie* par hypersécrétion d'insuline, ou le risque d'aggravation d'une hypoglycémie déjà existante, lors de traitement par la quinine en IV dans certains cas particuliers : paludismes graves avec parasitémie élevée (augmentation de la consommation de glucose par le parasite), insuffisance hépatique (épuisement des réserves), particulièrement chez la femme enceinte et chez le jeune enfant. Au coma parasitaire peut donc succéder un coma hypoglycémique.

■ *Intoxication aiguë*

La dose toxique est de plusieurs grammes (tentatives d'autolyse ou d'avortement). L'intoxication se traduit par une amaurose parfois définitive, par spasme de l'artère centrale de la rétine, une chute tensionnelle, des hallucinations et convulsions, une atteinte de la 8ᵉ paire de nerfs crâniens, une fibrillation ventriculaire, collapsus cardiovasculaire qui peut être terminal (doses de 5 à 7 g).

Le traitement sera réalisé en milieu de soins intensifs :

- toxicologique : lavage gastrique si intoxication récente ; diurèse osmotique ; charbon activé ;
- symptomatique : surveillance rénale, cardio-vasculaire et respiratoire.

■ *Contre-indications*

- Fièvre bilieuse hémoglobinurique (contre-indication absolue) ;
- Insuffisances hépatique ou rénale graves ;
- Troubles de la conduction (allongement PR, bloc de branche) ;
- Intolérance connue à la quinine ;
- Chez la femme enceinte, la quinine sera réservée en cas d'accès pernicieux.

■ *Interactions médicamenteuses*

Association contre-indiquée : astémizole : diminution de son métabolisme par la quinine entraînant un risque majoré des troubles du rythme.

Association déconseillée : méfloquine : risque majoré de crises convulsives. Respecter un délai de 12 heures entre les deux produits.

La quinine renforce et prolonge l'action des antivitamines K et des barbituriques. Elle augmente les concentrations sanguines donc la toxicité de la digoxine. Sa réabsorption tubulaire est augmentée par alcalinisation des urines.

b) La méfloquine – Lariam®

Antipaludique de synthèse préparé en 1971 et commercialisé en France en 1986, ce produit est un schizonticide sanguin majeur qui présente l'intérêt d'être actif sur la plupart des souches de *Plasmodium* résistantes aux 4-amino quinoléines. Cependant, certaines souches de *Plasmodium falciparum* sont résistantes à ce produit.

■ *Structure*

Comme la quinine, la méfloquine est un quinolyl-4 méthanol. Elle se caractérise par :

- un noyau quinoléine substitué par des groupements trifluorométhyles en 2 et 8 ;
- un cycle pipéridinique ;
- ces deux hétérocycles sont reliés par un groupement hydroxyméthylène.

L'ensemble comporte 2 atomes de carbone asymétriques, d'où l'existence de 2 racémiques (érythro et thréo).

■ *Relations structure-activité*

Le diastéréo isomère le plus actif et le moins toxique possède la configuration érythro (comme pour la quinine). C'est le racémique qui est utilisé en thérapeutique. Le groupement trifluorométhyle en 8 permet d'obtenir une activité antimalarique maximale. Le groupement trifluorométhyle en 2 permet d'éviter l'oxydation biologique en cette position et prolonge la durée d'action. Il élimine en outre les risques de phototoxicité.

commercialisé en France depuis 1989 et se trouve pour l'instant réservé au traitement des accès palustres à *Plasmodium falciparum* en zone de chloroquinorésistance.

■ *Structure*

L'halofantrine est un dérivé du phénanthrène-9 méthanol qui peut donc être considéré comme bio isostère des quinolyl-4 méthanols de type méfloquine. Comme cette dernière, elle présente dans sa structure des groupements lipophiles (CF_3 – Cl) dont le rôle semble essentiel à l'activité, en revanche elle ne possède qu'un seul atome de carbone asymétrique et l'atome d'azote de la chaîne latérale n'est pas hétérocyclique.

■ *Propriétés physico-chimiques*

Le chlorydrate d'halofantrine est très peu soluble dans l'eau.

■ *Pharmacocinétique*

Résorption : par voie orale elle est partielle et surtout sujette à des variations individuelles importantes. Les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes en 3 ou 6 heures et sont elles aussi très variables.
Métabolisme : le seul métabolite identifié est le dérivé débutylé, (20 à 30 %), il participe à l'activité du produit.
Élimination : elle est essentiellement fécale sous forme libre ou métabolisée. La demi-vie d'élimination présente elle aussi des variations individuelles importantes. Elle est de l'ordre de 24 à 48 heures pour l'halofantrine et de 48 à 96 heures pour son métabolite principal.

■ *Propriétés – Mode d'action*

L'halofantrine est un schizonticide érythrocytaire. Son mode d'action est encore très imparfaitement élucidé mais semble voisin de celui de la quinine et de la méfloquine.

■ *Indications – Posologie*

En aucun cas l'halofantrine ne doit être administrée à titre prophylactique de façon à retarder au maximum le développement des souches résistantes. Son utilisation doit être réservée au seul traitement des accès palustres à *Plasmodium falciparum* en zone de chloroquinorésistance.
La posologie totale recommandée chez l'adulte et l'enfant est de 24 mg/kg à répartir en 3 prises à 6 heures d'intervalle pour augmenter la quantité de produit résorbée.
- Adultes : 3 fois 2 comprimés à 6 heures d'intervalle ;
- Enfants : 3 fois 5 mL par 10 kg de poids à 6 heures d'intervalle.

■ *Effets indésirables*

Leur incidence semble inférieure à celle des autres produits. Il s'agit surtout de :
- troubles digestifs : diarrhées (6,8 %), douleurs abdominales (5,6 %), nausées et vomissements ;
- troubles cutanés : prurit, rash ;
- troubles neurologiques : vertiges, céphalées ;
- toux (6,3 %) ;
- troubles du rythme ventriculaire, torsades de pointes.

L'artéméther peut être utilisé par voie intramusculaire (Paluther®) selon deux schémas posologiques qui visent à administrer la dose curative totale de 480 mg chez l'adulte et de 9,6 mg/kg chez l'enfant, sur 3 ou 5 jours. L'artéméther est présenté en ampoules de 1 mL et de 0,5 mL contenant respectivement 80 mg et 40 mg du principe actif.
Il peut également être utilisé par voie orale sous forme de comprimés dosés à 100 mg (Artenam®).
La posologie est alors de 6 comprimés chez l'adulte, de 3,2 mg/kg chez l'enfant en une seule prise le premier jour, suivi de 2 comprimés chez l'adulte et de 1,6 mg/kg chez l'enfant, en une seule prise les 4 jours suivants.
L'artésunate est disponible sous forme de comprimés dosés à 50 mg (Arsumax®).
La posologie est de 2 comprimés chez l'adulte, de 2 mg/kg chez l'enfant matin et soir le premier jour, puis diminuée de moitié les 4 jours suivants.
Des formulations pour la voie rectale semblent également être très intéressantes.

■ *Effets indésirables*

L'artémisinine et ses dérivés sont généralement bien tolérés.
Des troubles sanguins (diminution des réticulocytes, plus rarement des leucocytes), hépatiques (élévation transitoire des transaminases), digestifs (nausées, vomissements, douleurs abdominales), cardiaques (bradycardie, bloc auriculo-ventriculaire) ont été observés.

■ *Contre-indications*

Grossesse.

■ *Association artéméther-luméfantrine*

L'artéméther peut être associé à la luméfantrine (benflumétol) sous la DCI de co-artéméther (Coartem®, Riamet®) dans la proportion de 1/6.
La luméfantrine est un dérivé du fluorène, analogue structural de la quinine, de la méfloquine et de l'halofantrine, développé par l'armée chinoise en 1987.

■ *Pharmacocinétique*

La résorption digestive du co-artéméther est très augmentée par la prise d'aliments. Les pics plasmatiques sont atteints en 1 ou 2 heures pour l'artéméther et en 6 ou 8 heures pour la luméfantrine. La fixation aux protéines plasmatiques est supérieure à 95 %. Il existe un passage transplacentaire et dans le lait maternel.
La luméfantrine est métabolisée au niveau hépatique, notamment par le CYP 3A4, en dérivé débutylé actif. L'élimination est fécale et urinaire. Le temps de demi-vie d'élimination est de 4 à 6 jours.

■ *Indications – Posologie*

L'artéméther est un schizonticide d'action rapide qui est associé à la luméfantrine pour éviter le risque important de rechutes en cas d'utilisation isolée de l'artéméther.
Le co-artéméther est donc utilisé par voie orale sous forme de comprimés (arthéméther (20 mg) + luméfantrine (120 mg)) dans le traitement curatif des accès palustres à *Plasmodium falciparum* chez l'adulte et l'enfant > 12 ans, de poids > 35 kg, en 6 prises (t, t + 8 heures, t + 24 heures, t + 36 heures, t + 48 heures, t + 60 heures) de 4 comprimés, au cours d'un repas.

Essai de pureté : aspect de la solution, détermination du pH, substances apparentées par CCM, métaux lourds, teneur en eau et cendres sulfuriques.
Dosage : azote basique en milieu non aqueux par l'acide perchlorique (potentiométrie).

■ *Pharmacocinétique*

• Chloroquine
Résorption : digestive rapide et importante (80 %). Pic plasmatique en 3 ou 4 heures.
Distribution : fixation aux protéines plasmatiques (50 %). Concentration importante dans les hématies saines et surtout parasitées (x 20). Demi-vie très variable selon la posologie, la méthode de dosage (10 à 30 jours selon les auteurs). Fixation réversible au niveau de différents tissus (foie-cœur-cerveau) d'où élimination lente et action prolongée. Elle traverse le placenta et passe dans le lait en faible quantité.
Métabolisme : le métabolite principal est la mono-déséthyl chloroquine (30 %) qui, bien que moins active que la chloroquine, se concentre dans les hématies et contribue à son efficacité. La bis-déséthyl chloroquine est beaucoup moins importante (5 à 10 %).
Élimination : lente et surtout urinaire (60 %) sous forme inchangée (70 %) ou sous forme de métabolites (30 %). Une partie est éliminée par voie fécale.

• Amodiaquine
Ses caractéristiques pharmacocinétiques sont très proches de celles de la chloroquine. Ce produit serait une « prodrogue » très rapidement transformée en dérivé monodéséthylé qui en constitue le principal métabolite actif. Sa demi-vie est très variable (1 à 10 jours).

■ *Indications – Posologies*

Les 4-amino quinoléines sont des schizonticides d'action rapide, puissante et prolongée, et constituent les médicaments de choix en l'absence de chimiorésistance.

***Traitement curatif* des formes sensibles à *Plasmodium falciparum, vivax, ovale et malariae* (accès palustre simple)**

• Chloroquine
– *Voie orale* : de loin la plus utilisée ;
  - adultes : 1er jour : 600 mg puis 300 mg 6 heures plus tard, les deux jours suivants : 300 mg,
  - enfants : 1er jour : 10 mg/kg puis 5 mg/kg 6 heures plus tard, les deux jours suivants : 5 mg/kg ;
– Voie IM : réservée aux cas d'intolérance digestive, elle doit être évitée chez les enfants de moins de 5 ans ;
  - adultes : 300 mg par jour pendant 5 jours,
  - enfants : 5 mg/kg/jour pendant 5 jours.

• Amodiaquine
– *Voie orale :* 35 mg/kg répartis sur trois jours : 1er jour 15 mg/kg en 2 prises, les 2 jours suivants 10 mg/kg en 2 prises. L'amodiaquine connaît un regain d'intérêt dans certains pays en raison de son efficacité sur certaines souches chloroquinorésistantes.


Hidden page

tes (*Pneumocystis carinii*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*). L'atovaquone et le proguanil exercent une action inhibitrice à deux niveaux différents de la synthèse des pyrimidines et provoquent ainsi l'inhibition de la réplication de l'ADN parasitaire.

■ *Effets indésirables*

Des troubles digestifs et cutanés peuvent être observés (nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, éruptions cutanées, rashs) ainsi que céphalées, anorexie et toux.

■ *Contre-indications*

- Antécédents d'hypersensibilité à l'atovaquone ;
- En l'absence de données, la prudence est recommandée en cas de grossesse ou d'allaitement.

f) Pyriméthamine

■ *Structure*

Elle appartient à la famille des 2,4-diamino pyrimidines. Il s'agit de la 2,4-diamino 5-(4- chloro phényl)6-éthyl pyrimidine.

■ *Propriétés physico-chimiques – Essai*

La pyriméthamine se présente sous forme d'une poudre blanche, inodore, insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool, très peu soluble dans l'éther.
Elle est inscrite à la Pharmacopée européenne (4e éd., 2002).
Identification : point de fusion, spectrophotométrie UV et IR – CCM.
Essai de pureté : aspect de la solution. Acidité ou alcalinité d'une solution aqueuse. Évaluation des substances apparentées par CCM.
Évaluation des sulfates, des cendres sulfuriques et de la perte à la dessiccation.
Dosage : titrage des bases organiques en milieu non aqueux. Elle se comporte comme une base monovalente.

■ *Pharmacocinétique*

La résorption digestive de la pyriméthamine est lente et incomplète. Elle passe la barrière placentaire et dans le lait et s'accumule dans le foie. Elle est partiellement métabolisée et éliminée par voie urinaire et fécale. Elle se caractérise surtout par une demi-vie plasmatique très longue (4 jours environ) permettant une utilisation hebdomadaire en prophylaxie.

■ *Indications et posologie*

La pyriméthamine est un schizonticide sanguin dont l'action est lente à se manifester et qui se trouve confrontée, comme le proguanil, au problème des souches résistantes de *Plasmodium*. Elle n'est pratiquement plus utilisée seule mais en association avec la sulfadoxine (Fansidar®) et uniquement à titre curatif.
Ce produit connaît actuellement un regain d'intérêt lié au développement des cas de toxoplasmose cérébrale qui constitue, avec la pneumocystose, une complication fréquente et sévère du Sida. L'association pyriméthamine (50 à 100 mg/24 h) sulfadiazine (6 g/24 h) représente une des seules thérapeutiques efficaces dans ce cas.

IV. Gamétocytocides

Les 8-Amino quinoléines

Il s'agit des **8-amino quinoléines** issues des recherches menées à partir du bleu de méthylène et dont le chef de file, ***la pamaquine***, fut le premier antipaludique de synthèse (1924).

Actuellement cette famille est représentée par la ***primaquine*** et le ***quinocide*** qui ne sont cependant pas commercialisés en France.

■ *Structure – Relations structure-activité*

Ces produits sont des dérivés de la 6-méthoxy quinoléine substituée en 8 par une chaîne aminée de type aminoalkylamino.

Le quinocide, isomère de la primaquine, présenterait un index thérapeutique inférieur. Ces deux produits possèdent un atome de carbone asymétrique et c'est le racémique qui est utilisé.

■ *Propriétés physico-chimiques – Essai*

Le diphosphate de primaquine est inscrit à la Pharmacopée européenne (4ᵉ éd., 2002) : poudre cristalline orangée, soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'alcool.

L'identification peut être réalisée par spectrophotométrie UV et IR, CCM, réaction des phosphates.

L'essai de pureté comporte : substances apparentées (CLHP), perte à la dessiccation.

Dosage : azote basique en milieu non aqueux par l'acide perchlorique avec détermination du point d'équivalence par potentiométrie.

■ *Pharmacocinétique*

La primaquine est résorbée rapidement et de façon incomplète par le tube digestif. Sa diffusion tissulaire est large. Elle est métabolisée, en partie, au niveau hépatique et ses deux principaux métabolites, la 5-hydroxy primaquine et la 6-desméthyl 5-hydroxy primaquine, sont inactifs mais possèdent une activité hémolytique nettement supérieure.

Son élimination est urinaire, sous forme libre ou métabolisée, avec une demi-vie de l'ordre de 3 à 6 heures.

■ *Indications – Posologie*

Les 8-amino quinoléines sont actives sur les formes tissulaires (exo-érythrocytaires) et sur les formes sexuées (gamétocytes) du *Plasmodium*. En pratique, elles ne restent utilisées que pour réaliser les cures radicales des infections à *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale*, c'est-à-dire pour éviter les rechutes à long terme.

La posologie habituelle est de 15 mg de primaquine base par jour pendant 14 jours ou de 45 mg de primaquine base, en une prise hebdomadaire, et en association avec un schizonticide sanguin (4-amino quinoléine en général).

■ *Effets indésirables*

Les 8-amino quinoléines sont en général bien tolérées aux doses utilisées. Des troubles digestifs (crampes abdominales) sont parfois observés, de même que des troubles sanguins (anémie, leucopénie, méthémoglobinémie).

En revanche, il faut redouter une hémolyse chez les sujets présentant un déficit en G6PD (déficit fréquemment rencontré dans la population noire).

■ *Contre-indications*

- Déficit en G6PD ;
- Ne pas associer aux médicaments potentiellement hémolytiques.

V. Perspectives

La multirésistance des souches de *Plasmodium* à l'action des antipaludéens est devenue un problème de santé publique majeur qu'il convient de solutionner en offrant de nouvelles alternatives prophylactiques et thérapeutiques.

Chimioprophylaxie et chimiothérapie

La connaissance du mode d'action des dérivés de l'artémisinine a permis le développement de composés synthétiques dérivés du trioxane. Plus récemment, l'association d'une 4-aminoquinoléine et d'un trioxane a débouché sur une famille de molécules bimodales très active *in vitro* contre le paludisme : les trioxaquines. Les dérivés des spiro et dispiro 1,2,4-trioxolane constituent une nouvelle classe très prometteuse d'antipaludiques synthétiques.

- La fosmidomycine est le premier représentant d'une nouvelle classe d'antipaludiques qui cible l'apicoplaste, un organite du parasite, en inhibant une enzyme clé (1-deoxy-D xylulose 5-phosphate réducto-isomérase ou DOXP) de la synthèse des isoprénoïdes. Il est toutefois préférable de l'utiliser en association avec la clindamycine car 4 à 5 jours de traitement sont nécessaires. Les fluoroquinolones qui bloquent des topoisomérases spécifiques pourraient également être actives sur cette cible.
- La tafénoquine (Etaquine®) est une 8-aminoquinoléine à action prolongée qui peut être utilisée, contrairement à la primaquine, à des fins prophylactiques chez des sujets présentant un déficit en G6PD.
- La phosphatidylcholine est indispensable à la croissance et à la formation de la membrane des parasites infestant les globules rouges. Elle est synthétisée à partir de la choline extraite du plasma. La protéine qui la transporte est l'étape limitante de sa biosynthèse et apparaît de ce fait comme une cible thérapeutique potentielle. Les bis-ammoniums quarternaires, analogues à la choline, sont doués d'une activité antipaludique en interférant avec le métabolisme phospholipidique de *Plasmodium falciparum*.

La recherche d'agents susceptibles de reverser la résistance des *Plasmodium* aux antipaludéens classiques est une stratégie intéressante qui nécessite la connaissance des mécanismes mis en œuvre par les parasites pour diminuer rapidement l'efficacité des produits utilisés. Les parasites chloroquinorésistants sont capables de dégrader le complexe toxique chloroquine-hème par l'action d'un hème oxygénase, ou d'accélérer l'efflux de la chloroquine selon un mécanisme particulier reconnaissant diverses molécules. Afin de bloquer ce mécanisme, des dérivés de la bis-acridine, non reconnus par les protéines impliquées dans l'efflux, ont été déve-

loppés. Le couplage d'une molécule de chloroquine à une molécule de ferrocène (fer organique), appelé ferroquine, permet de lever la résistance à la chloroquine de souches de *Plasmodium falciparum* chloroquinorésistantes. La ferroquine n'est pas expulsée de la vacuole nutritive des parasites résistants.
Des travaux très récents exploitant la découverte d'une voie métabolique indispensable à la croissance des protozoaires, la voie de l'acide mévalonique, ont abouti à des inhibiteurs de la prolifération de *Plasmodium falciparum* : les biphosphonates.

Immunothérapie

L'apparition de résistances aux différents antipaludéens utilisés a justifié la mise au point d'un vaccin car le paludisme induit une immunité partielle chez ceux qui le contractent. Cependant, les nombreuses tentatives vaccinales se sont heurtées à la complexité du cycle parasitaire dans l'hôte et à la grande variété antigénique qui en découle. La difficulté réside donc dans le choix des sous-unités antigéniques qui offriront la meilleure immunité contre l'infection. Ces candidats vaccins combinent des protéines ou des fragments de protéines antigéniques présentes dans les stades érythrocytaires du parasite et résultant de la synthèse peptidique ou du génie génétique. Trois types de vaccins sont en cours de développement : les vaccins « antistade exo-érythrocytaire », les vaccins « bloquant la transmission » et les vaccins « antistade sanguin asexué ».
La mise au point d'un vaccin qui neutralise la GPI (glycosylphosphatidylinositol), une toxine produite par le parasite, offre une nouvelle approche vaccinale.
Afin de faciliter le développement des vaccins et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, les décryptages des génomes du *Plasmodium falciparum* et de l'anophèle ont été réalisés.
Il n'est pas inutile enfin de rappeler que la prévention contre le paludisme repose également sur les mesures de protection contre les piqûres de moustiques (répulsifs, insecticides, précautions vestimentaires, moustiquaires, etc.).

L'essentiel de la question

Le paludisme (malaria) constitue une affection parasitaire majeure : il concerne 40 % environ de la population mondiale et il est responsable chaque année de 400 millions de cas cliniques et de 2 à 3 millions de morts. Il résulte de l'infection par un protozoaire du genre *Plasmodium* (*falciparum*, *vivax*, *malariae* ou *ovale*) transmis à l'homme par un moustique, l'anophèle.
Les médicaments utilisés dans le traitement et/ou la prophylaxie de cette affection sont habituellement classés en fonction de leur cible, représentée par une (ou plusieurs) étape (s) du cycle évolutif du parasite.

- Les schizonticides sanguins agissent sur le stade érythrocytaire responsable des symptômes cliniques de la maladie. Ils se répartissent en deux catégories selon leur rapidité et leur mode d'action ainsi que leur capacité à induire des résistances :
  - produits d'action rapide : quinine, chloroquine, amodiaquine, méfloquine, halofantrine, artémisinine et dérivés ;
  - produits d'action lente : proguanil, pyriméthamine, sulfamides, antibiotiques. Ils sont le plus souvent utilisés en associations synergiques soit entre eux (pyriméthamine et sulfadoxine), soit avec les précédents (proguanil et chloroquine).

- Les schizonticides tissulaires sont actifs sur les formes exo-érythrocytaires et sont utilisés soit pour prévenir les rechutes dues aux hypnozoïtes des espèces *vivax* et *ovale*, soit pour les cures radicales.
- Les gamétocytocides détruisent les formes sexuées sanguines et permettent d'interrompre le cycle évolutif entre l'homme et l'anophèle. Ils ne sont pratiquement pas utilisés pour cette seule action mais pour leurs effets associés : schizonticides sanguins (quinine), schizonticides tissulaires (primaquine).

Les indications (traitement curatif et/ou prophylaxie) et les modalités d'utilisation de ces médicaments sont étroitement liées à la zone géographique impliquée (nature de la souche, présence ou non de résistance), à leurs caractéristiques pharmacocinétiques et à leurs effets indésirables.

Selon les recommandations de l'OMS, les pays concernés par cette affection sont répartis en 3 groupes :

- groupe I : pas de *Plasmodium falciparum* ou absence de chimiorésistance ;
- groupe II : chloroquinorésistance présente avec faible risque ;
- groupe III : prévalence élevée de chloroquinorésistance ou multirésistance.

La quinine reste le traitement curatif de référence pour les formes sévères à *Plasmodium falciparum* et la chloroquine, seule ou associée au proguanil, pour la prophylaxie dans les pays des groupes I et II.

L'émergence de plus en plus importante de souches multirésistantes constitue un problème de santé publique majeur et justifie la nécessité de recherches pour l'identification de nouvelles cibles et de nouvelles thérapeutiques.

Pour en savoir plus

- *Dictionnaire Vidal 2006*, 82e éd., éditions du Vidal, Paris, 2006.
- Santé des voyageurs et recommandations sanitaires. *BEH* 2005 ; 24/25 : 117-28.
- *Guidelines for the treatment of malaria*, World Health Organization, Genève, 2006.

Les antiviraux par voie générale

A. CERTAIN, Pharmacien hospitalier, hôpital Bichat-Claude Bernard, AP-HP, Paris.

I. **Classifications selon les familles virales, selon le mécanisme d'action et la famille chimique**

II. **Différentes familles**

A. Antiherpétiques (HSV 1 et HSV 2 ; CMV)
B. Médicaments actifs sur les virus des hépatites B et C
C. Médicaments actifs sur certains myxovirus
D. Médicaments antirétroviraux

Les médicaments antiviraux constituent une classe thérapeutique encore peu étoffée en regard de la classe des antibiotiques. Entre 1980 et 2000, ont été commercialisés non seulement les molécules actives sur les virus de l'immunodéficience humaine (VIH 1 et VIH 2) mais aussi des médicaments actifs sur les virus grippaux et les virus respiratoires syncytiaux, ainsi que des prodrogues actives sur les virus herpès (HSV, CMV).

Les progrès ont été lents depuis l'utilisation des premiers médicaments, dans les années 1950 ; en effet, les virus étant des micro-organismes utilisant la machinerie métabolique des cellules qu'ils infectent, la cellule hôte (bactérienne, végétale ou animale), il s'agit de trouver des molécules inhibant le plus spécifiquement possible une ou plusieurs des étapes du cycle viral tout en limitant les toxicités cellulaires. Néanmoins, que ce soient les anciens ou les nouveaux principes actifs, ce sont encore des agents virustatiques et non virucides. Certains produits locaux sont virucides (eau de Javel). Ces médicaments ne sont donc pas efficaces sur les virus en phase de latence.

Un des premiers antiviraux, la guanidine, a été testé pour inhiber l'ARN-polymérase des poliovirus et de la plupart des entérovirus ; mais malgré son absence de cytotoxicité et son excellente efficacité in vitro, les virus mutants guanidine-résistants ont émergé très rapidement, rendant inutilisable cette molécule en clinique par exemple dans la poliomyélite expérimentale du singe. Un dérivé voisin, la moroxydine (ou ABOB ou abitilguanide anciennement commercialisé sous le nom de Virustat) a été utilisé contre le zona, l'herpès et la varicelle et, associé à l'acide acétyl-salicylique, a été prescrit sous le nom d'Assur pour le traitement de la grippe et des viroses touchant la sphère ORL.

La cytosine arabinoside, déjà utilisée en hématocancérologie, avait fait l'objet d'essais dans les infections herpétiques, mais sa toxicité hématologique l'a fait abandonner. La méthisazone (Marboran, dérivé de la thiosemicarbazone) avait démontré une activité sur les virus à ARN et à ADN, et plus particulièrement sur les poxvirus ; c'est dans la prévention de la variole qu'elle avait surtout été utilisée, per os, ainsi que dans le traitement précoce des complications de la vaccine, sauf dans le cas de l'encéphalite post-vaccinale pour laquelle elle est inefficace. La variole ayant perdu de son actualité à la fin du xxe siècle, elle a été abandonnée, malgré la persistance d'autres maladies humaines à poxvirus (cowpox, orf des éleveurs de bétail, monkeypox en Afrique). L'actualité de la menace bioterroriste par les poxvirus a relancé la recherche sur des principes actifs efficaces (cidofovir et dérivés éther-lipidiques (HDP, ODE-CDV), adéfovir dipivoxil, HPMPA, acide glycyrrhizique).

Ont suivi, à la fin des années 1950, des dérivés de la pyrimidine, analogues à la thymidine, l'uridine ou la cytidine. Il s'agit de la 5-iodo-2'-désoxyuridine (IUdR ou iododésoxyuridine ou idoxuridine ou IdU), premier antiviral découvert en 1959 et commercialisé en 1963 pour les kératites herpétiques dans leur forme récente ; il a été retiré du marché en 2002 (Iduviran, collyre 0,12 %). Il en a été de même pour le gel ophtalmique V POS qui contenait aussi l'IdU. Sa toxicité systémique importante sur les cellules à renouvellement rapide (phanères, embryon, foie) empêchait son utilisation par voie générale. Par voie locale, l'ibacitabine, (5-iodo-2'désoxycytidine (ICdR ou IdC)) est encore prescrite sous le nom de Cuterpès® (gel 1 %), dans l'herpès labial récidivant ; la 5-trifluorométhyl-2'-désoxyuridine (F3TdR ou TFT ou trifluridine) en collyre a été prescrite sous les noms de Triherpine (retrait en 2001) et de Trifluridine Chauvin (retrait en 2004) ; en revanche, le collyre de TFT, Virophta® (50 mg/5 mL, 1 %) est toujours disponible en 2007 pour le traitement des atteintes oculaires herpétiques et de certaines kératites et kérato-uvéites.

I. Classifications selon les familles virales, selon le mécanisme d'action et la famille chimique

Les médicaments antiviraux peuvent être classés selon leurs mécanismes d'action pharmacologiques, leurs structures chimiques, leurs cibles virales.

Considérations pharmacologiques

Les infections virales sont souvent bénignes et ne requièrent pas de traitement car la réaction inflammatoire immune provoquée par la lyse cellulaire met fin à la réplication virale ; d'autres sont prévenues par des vaccins ; d'autres encore sont graves, durables et chroniques (herpès, zona), certaines enfin sont mortelles de façon aiguë ou différée car il n'y a pas de réactions inflammatoires provoquées par les virus (fièvre hémorragique) ou encore, la réponse immunitaire de l'hôte est pathologique, voire détournée de ces cibles fonctionnelles par le virus lui-même (VIH).

Les médicaments antiviraux doivent agir sur des micro-organismes intracellulaires, véritables parasites du génome de la cellule hôte, dans lequel ils s'insèrent tout en utilisant les ressources métaboliques de cette dernière.

Actuellement, les principes actifs antiviraux ne sont pas virucides ; détruire les virus aboutirait à altérer, voire détruire également le génome de la cellule hôte, par voie de conséquence la cellule elle-même.

Des tentatives de neutralisation de la séquence virale intégrée sont en cours grâce à des oligonucléotides antisens se fixant électivement sur les nucléotides viraux et inactivant leur expression ou leur fonction ; la thérapie génique permettant d'introduire des séquences bloquantes ou perturbatrices des provirus, permettra dans un avenir plus ou moins proche de disposer de thérapies conduisant à de vraies guérisons des maladies virales.

Les antiviraux utilisés sont donc virustatiques car ils inhibent spécifiquement la réplication virale, ou parfois la transcription ou la translation des séquences nucléotidiques de la cellule, incluant celle du virus infectant. Si cette inhibition doit tendre à être la plus sélective possible du métabolisme viral, par exemple par inhibition de l'absorption du virus sur son récepteur cellulaire, sa pénétration, sa décapsidation, son assemblage ou sa libération, malheureusement, l'inhibition d'étapes communes avec les cellules hôtes est fréquente telles que la transcription et la translation, conduisant à l'altération de ces dernières à plus ou moins long terme.

Cette inhibition, spécifique ou non, s'exerce uniquement pendant la durée de la présence de l'antiviral, lui-même en concentration suffisante sur la cible (enzyme de réplication ou de polymérisation, etc.).

En l'absence d'activité virale et/ou cellulaire et/ou d'exposition suffisante à l'antiviral, aucune efficacité n'est à attendre. En outre, la pharmacocinétique intracellulaire des antiviraux est encore largement méconnue, alors que sa maîtrise conditionne l'efficacité, la spécificité et la tolérance des traitements ; l'acquisition de méthodes de mesures intracellulaires et la possibilité de corréler les données *in vitro* et *in vivo* sont toujours les défis des travaux actuels.

Par la résolution de ces difficultés, il sera possible d'espérer limiter l'émergence des résistances aux antiviraux qui sont des facteurs limitants majeurs du succès des thérapeutiques, notamment dans le cadre de l'infection par le VIH, le VHC ou le VHB.

Tableau 1. Classification des antiviraux selon leur mécanisme d'action (d'après Goodman et Gilman, 1998, Huraux, 2002)

Étapes de réplication virale	Type d'inhibiteurs	Exemples	Infection virale concernée
Entrée dans la cellule hôte Adhésion Pénétration	– Faux récepteurs solubles – Anticorps antirécepteurs	CD4 solubles Anti-CD4 (TNX-355) Palivuzimab	VIH VRS
Décapsidation Libération du génome viral	– Antagonistes des canaux ioniques – Stabilisateurs de capside – Inhibiteurs de la fusion protéique – Inhibiteurs d'entrée	Amantadine, rimantadine Enfuvirtide, T651, TRI999, TRI1144 Anti-CCR5 maraviroc, vicriviroc, Anti-CXCR4 (KRH-3955, KRH-3140) ; (AMD-3465)	Influenza virus VIH
Transcription du génome viral Transcription de l'ARNm viral Réplication du génome viral	– Inhibiteurs des phosphokinases – Inhibiteurs des ADN polymérases, cellulaires α et β, mitochondriales γ, virales – Inhibiteurs de l'ARN polymérase – Inhibiteurs de la reverse transcriptase – Inhibiteurs de la gyrase, de la primase, l'hélicase – Inhibiteurs de l'intégrase – Oligonucléotides antisens – Ribozymes	*Nucléosides MP, DP, TP :* AZT-MP, 3TC-MP, riba-MP, FTC-MP, DOT FLG, entécavir aciclovir, IdU, vidarabine ganciclovir, cidofovir, HDP, ODE-CDV ddCTP, ABC, BCNA, foscarnet, maribavir, benzimidavir ddA-TP, riba-TP ribavirine, (et ses dérivés lévovirine, viramidine) *Non nucléosidiques :* EFV, NVP, DLV, TMC 125, TMC 278 *Nucléotides* AZT-TP, ddA-TP, ddCTP, dd riba-TP, GS-9148, ADF, TNF, DAPD, BAY41-4109, MK-0518, GS-9137	VIH HSV 1 et 2, VHB, CMV, VZV, EBV Pox-virus VHC, filovirus Influenza VHC VIH VIH + VHB
Translation des protéines virales Protéines de régulation Protéines de structure	– Inhibiteurs des protéines de régulation		
Modifications post-translationnelles Clivage protéolytique Myristoylation, glycosylation	– Inhibiteurs de la neuraminidase – Inhibiteurs de la protéase	ZNMV, OSLV RTV, SQV, IDV, NFV, APV, LPV, ATV, TPV, TMC 114, GW 640385 Anti-NS3-4A (SCH-503034, Vx-950, BILN-2061)	Influenza VIH_1 et VIH_2 VHC
Assemblage des composants du virion	– Interférons – Inhibiteurs de l'assemblage protéique – Inhibiteurs de maturation	Interférons alpha UK-201844, PA-457	VHB, VHC VIH
Libération Bourgeonnement, lyse cellulaire	– Anticorps antiviraux – Lymphocytes cytotoxiques		

Enfin, il est indispensable de préciser que les antiviraux n'exercent pleinement leur action qu'en présence d'une immunité suffisante de la part de l'organisme atteint. Le *tableau* ci-dessus présente une classification des antiviraux selon leurs cibles ; il est ainsi facile de remarquer que certaines cibles virales ont fait l'objet de nombreuses recherches, aboutissant à des médicaments disponibles commercialisés ; ce sont les inhibiteurs de l'ADN et de l'ARN polymérase, de la réverse transcriptase et de la protéase de clivage post-translationnelle. Des principes actifs sur les autres cibles virales sont encore rares, notamment sur l'inhibition de la décapsidation, de la régulation des protéines, de l'assemblage du virus et de sa libération.

Tableau 2. Spectre d'activité, *in vitro*, des principaux antiviraux

Famille virale		ACV	PCV	GCV	PFA	VDR	CDV	Nucs *	Nuct **	Nnuc ***	IP ****	Ifus°	ADF	ETV	RBV	IFNα	AMT	ZNM	OST	Pmab
HERPES	HSV1																			
	HSV2																			
	VZV																			
	EBV							AZT												
	CMV																			
VIH	VIH1																			
	VIH2																			
HEPATITE	HBV							3TC, FTC	TNF											
	HCV																			
MYXO	Vinfl																			
	VRS																			
PAPO	JCV						?													
	PapiV																			
FILO Arena	Marb																			
	Ebola																			
	Lassa																?			
AUTRE							Polyo adeno								Adeno, pox					

Sigles : *ACV* : *aciclovir* ; *PCV* : *penciclovir* ; *GCV* : *ganciclovir* ; *PFA* : *phosphonoformate (foscarnet)* ; *VDR* : *vidarabine* ; *CDV* : *cidofovir* ; *ETV* : *entecavir* ; *Nucs* : *analogues nucléosidiques de la reverse transcriptase* ; *Nuct* : *analogues nucléotidiques de la reverse transcriptase* ; *Nnuc* : *analogues non nucléosidiques de la reverse transcriptase* ; *IP* : *inhibiteurs de la protéase du VIH* ; *Ifus* : *Inhibiteur de fusion* ; *ADF* : *adéfovir* ; *RBV* : *ribavirine* ; *3TC* : *lamivudine* ; *TNF* : *ténofovir* ; *AZT* : *zidovudine* ; *IFNα* : *interféronα* ; *AMT* : *amantadine* ; *ZNM* : *zanamivir* ; *OST* : *oseltamivir* ; *Pmab* : *palivuzimab* ; *AV* : *antiviral* ; *MYXO* : *myxovirus* ; *PAPO* : *Papovavirus* ; *FILO* : *filovirus* ; *Arena* : *arenavirus* ; *Vinfl* : *virus influenza* ; *PapiV* : *papillomavirus* ; *Marb* : *marburg* ; *Polyo* : *polyovirus* ; *adeno* : *adenovirus* ; *pox* : *poxvirus*.

Pas d'activité antivirale	Activité selon AV	+	++	+++	++++Activité antivirale

Les herpèsvirus sont des virus à ADN, de structure cubique, enveloppés. Ce sont des virus de structure complexe, nécessitant des enzymes spécifiques, différentes de celles de la cellule hôte infectée ; il s'agit notamment d'une ADN polymérase et d'une thymidine kinase (TK), toutes deux propres aux virus herpès (sauf CMV et EBV pour la TK). Ces enzymes sont des cibles privilégiées sélectives pour les médicaments antiviraux, notamment pour la TK, permettant une moindre toxicité pour la cellule infectée.

1. Présentations

Les 8 médicaments commercialisés en 2007, actifs sur les Herpèsviridés, sont au nombre de 5 principes actifs et de 3 prodrogues. Leurs présentations figurent dans le *tableau* ci-contre *(tableau 4)*.
La trifluorothymidine (Virophta®), antiherpétique, est uniquement utilisée par voie locale.

2. Propriétés physico-chimiques

Les principes actifs antiherpétiques sont des inhibiteurs de l'ADN polymérase virale dont les structures sont des analogues nucléosidiques de la guanosine (l'aciclovir et son ester de valine le valaciclovir, le penciclovir et son diacétyl ester, le famciclovir, le ganciclovir et son ester de valine, le valganciclovir) ; un analogue nucléotidique de la cytosine, le cidofovir, et un inhibiteur non-nucléosidique, le foscarnet, sont les deux seuls composés monophosphorylés.
Leur formule développée ainsi que les caractéristiques physico-chimiques figurent ci-dessous.

Tableau 3. Caractéristiques physico-chimiques des anti-viraux antiherpétiques

DCI	Aciclovir (ACV) *et Valaciclovir*	Penciclovir (PCV) *et Famciclovir*	Ganciclovir (GCV) *et Valganciclovir*	Cidofovir (CDV)	Foscarnet (PFA)
Formule développée	Ester L-valyl-ACV	Ester diacétyl-PCV	Ester L-valyl-GCV		
Dénomination chimique	(9-[(2-hydroxyéthoxy) méthyl] -9H-guanine)	(9-[4-hydroxy-3-hydroxyméthylbut-1-yl]guanine)	(9-[1,3-dihydroxy-2-propoxyméthyl] guanine)	(1-[(S)-3hydroxy-2-(phosphonylméthoxy) propyl]cytosine)	Phosphonoformate disodique
Aspect poudre	Blanche cristalline				
Solubilités					
Eau	+		+	Légèrement	+
Solvants organiques	–		–	–	–
Dosage	HPLC		HPLC	HPLC	HPLC
pKa	2,5 ; 9,4		2,2 ; 9,4	1,7 ; 4,7 ; 6,9	
Solution aqueuse	Très basique		Très basique		Très basique
Forme IV et administration parentérale	Oui Dilution et hydratation +++	Non	Oui Dilution et hydratation +++	Oui Dilution et hydratation +++	Oui Dilution et hydratation +++

tamponnées et diluées pour les administrations injectables, pour limiter la toxicité veineuse et les douleurs lors des administrations parentérales (exemple : Cymévan® IV). Seuls le penciclovir et son ester, le famciclovir, ne se présentent pas sous formes injectables.

3. Propriétés pharmacologiques et mécanismes d'action

a) Aciclovir

Les analogues nucléosidiques de la guanosine tels que l'aciclovir, le penciclovir et le ganciclovir n'ont pas d'activité antivirale par eux-mêmes. L'aciclovir doit subir une première phosphorylation (en ACV-monophosphate), une deuxième et une troisième pour que l'ACV-triphosphate exerce son activité antivirale par inhibition sélective de l'ADN polymérase de l'herpèsvirus. La première phosphorylation de l'ACV est réalisée par la thymidine kinase virale, (des HSV ou des VZV) 30 à 120 fois plus efficace que la thymidine kinase de la cellule hôte. Le monophosphate d'ACV est ensuite bi et triphosphorylé par les kinases cellulaires ; ce dernier composé triphosphate inhibe alors avec une haute affinité l'ADN polymérase virale, plutôt que l'ADN polymérase cellulaire. Il s'ensuit que l'ADN cellulaire est épargné et que l'index thérapeutique de l'aciclovir est excellent, dans la mesure où les doses inhibant les virus sont 3 000 fois moindres que celles qui inhibent la multiplication des cellules.
Certaines molécules d'ACV-triphosphorylées s'incorporent dans le brin d'ADN viral en formation grâce à l'ADN-polymérase, ce qui aboutit à l'arrêt de l'élongation de la chaîne, car l'absence du groupement 3'OH des pentoses sur l'ACV-triphosphate ne permet pas l'attachement d'autres nucléosides. Ce mécanisme est retrouvé dans l'inhibition des HSV 1, HSV 2 et VZV ; dans le cas des EBV, malgré l'absence de thymidine kinase virale, l'ADN polymérase du virus est très sensible à de très faibles quantités d'ACV phosphorylées par les seules kinases cellulaires. En revanche, le CMV est très peu sensible à l'ACV ; il n'a pas de thymidine kinase virale ; néanmoins, il est maintenant démontré que l'ACV est bénéfique pour la prévention des infections à CMV chez les greffés de rein et de moelle, mais il n'est pas efficace sur l'infection déclarée. L'ACV a des effets antiviraux transitoires sur la mononucléose infectieuse ; il améliore la leucoplasie buccale chevelue liée à l'EBV.
Les mécanismes de résistance des virus herpès (HSV et VZV) à l'aciclovir sont de trois sortes : le phénomène le plus fréquent est l'absence ou la production partielle de TK par mutations partielles, délétions ou insertions de bases dans les gènes correspondants ; moins souvent, il est observé une altération de la spécificité des substrats de la thymidine kinase ou une altération de l'ADN polymérase.

b) Ganciclovir

Analogue de la guanine, il comporte une chaîne hydrocarbonée acyclique à la place du pentose, paraissant équivalent au groupe 3'OH. La première phosphorylation du ganciclovir dans les cellules infectées par le CMV, dépourvu de TK, est réalisée par une phosphotransférase virale, codée par un gène UL97. L'absence de ce gène confère la résistance au CMV et empêche la phosphorylation du ganciclovir. Cette spécificité apparente est contradictoire avec la grande toxicité du ganciclovir

pour les cellules humaines, cellules sanguines médullaires et de la reproduction notamment. Le ganciclovir est aussi actif sur les virus porteurs d'une TK tels que les HSV 1 et 2, les VZV et EBV. Les bi et triphosphorylations sont effectuées par les enzymes cellulaires ; la forme triphosphate inhibe compétitivement l'ADN polymérase et l'incorporation de la désoxyguanosine triphosphate dans l'ADN viral et cellulaire, aboutissant au blocage définitif de l'ADN viral.
Les mécanismes de résistance du CMV au ganciclovir mettent en jeu des mutations ou des délétions sur le gène UL97 *et*/ou sur le gène de l'ADN polymérase virale ; les souches HSV aciclovir-résistantes, par déficit en TK, sont aussi généralement moins sensibles au ganciclovir.

c) Penciclovir

Il est lui aussi monophosphorylé par la TK virale dans les cellules infectées par HSV ou VZV ; puis après une bi et une triphosphorylation, le composé inhibe compétitivement l'ADN polymérase virale. Bien que le penciclovir triphosphate est 100 fois moins actif que l'aciclovir triphosphate comme inhibiteur, il est présent de manière durable et en concentrations élevées dans les cellules infectées, permettant l'efficacité constatée. Les variants résistants sont porteurs de mutations de la thymidine kinase ou de l'ADN polymérase. Mais la moins grande utilisation du penciclovir et de son dérivé, le famciclovir, comparée à celle de l'aciclovir, a pour conséquence un manque de connaissances de l'activité antivirale et des résistances de ces composés.

d) Cidofovir

Molécule nucléotidique, donc monophosphorylée, il doit subir 2 phosphorylations par des kinases cellulaires pour être actif en tant qu'analogue triphosphaté de la cytidine. Le cidofovir ne requiert donc pas l'intervention de la TK pour sa première phosphorylation.
L'originalité du cidofovir réside dans la longue demi-vie intracellulaire de ses métabolites, le cidofovir diphosphate et le cidofovir phosphocholine (17 à 65 heures et > 87 heures respectivement) ; c'est la raison pour laquelle ces réserves intracellulaires permettent des administrations intraveineuses très espacées (de 7 jours à 14 jours). Le cidofovir diphosphate inhibe compétitivement la synthèse de l'ADN viral par action sur l'ADN-polymérase, empêchant l'incorporation de la désoxycytosine-5'-triphosphate dans la chaîne d'élongation. La spécificité du cidofovir vis-à-vis de l'ADN polymérase virale est beaucoup plus importante que vis-à-vis des ADN polymérases α, β et γ des cellules hôtes, aussi bien dans les cas des CMV que dans les cas des HSV.
Le cidofovir semble actif sur des modèles animaux tels que des infections à herpès dépourvu de TK, à polyomavirus, ou des vaccines chez la souris, des varicelles du singe vert d'Afrique, ou enfin des infections à adénovirus chez le lapin. Quelques cas cliniques de ces infections ont été publiés dans la littérature médicale, dans laquelle a été également rapportée une certaine activité du cidofovir sur les *Papovaviridae*, et mise à profit en clinique (infection à virus JC responsable de la leucoencéphalopathie multifocale progressive ou LEMP, et infections à papillomavirus – en voie locale –, HPV6, 16 et *Molluscum contagiosum* dans l'immunodépression due à l'infection par le VIH).

Tableau 5. Propriétés pharmacocinétiques des antiviraux antiherpétiques

Paramètres	Aciclovir (ACV)	Valaciclovir	Penciclovir (PCV)	Famciclovir	Ganciclovir (GCV)	Valganciclovir	Cidofovir (CDV)	Foscarnet (PFA)
Biodisponibilité orale	10 à 20 % (↓ si dose ↑)	54 % (hydrolyse lors 1er passage)	5 %	65 à 77 % (désacétylation)	6 %	60 %	—	12 à 22 %
Effet des repas sur SSC	↓ 18 %	Indifférent	—	Indifférent	↑ 20 %	↑ 30 %	—	Négligeable
Pic plasmatique	1 à 2 heures	2 heures	—	2,3 heures	1h	?	1 heure	NR
Cmax/Cmin (dose)	9/0,7 µg/mL (5 mg/kg IV) ; 20,7/2,3 µg/mL (10 mg/kg IV)	8,4 / 2,5 µg/mL (2000 mg x 4 /j)	12 µg/mL/— (10 mg/kg IV)	3,5 µg/mL/— (500 mg)	7,09/ 0,85 µg/mL (5 mg/kg IV)	6,7 µg/mL [GCV]/— (900 mg valGCV)	Avec probénécide : 19,6 ± 7,2 µg/mL/— (5 mg/kg IV)	512/115 µM/L (60 mg/kg)
Concentrations inhibitrices	HSV1 : 0,02 à 0,9 µg/mL HSV2 : 0,03 à 2,2 µg/mL VZV, EBV : 0,8 à 4 µg/mL CMV, HHV6 : 20 µg/mL		HSV : 0,06 à 4,4 µg/mL VZV : 1,6 à 8 µg/mL		HSV : 0,02 à 2,2 µg/mL VZV : 0,8 à 4 µg/mL CMV : 0,2 à 2,8 µg/mL		CMV : 0,1 à 2 µg/mL	HSV, VZV : 80 à 120 µM CMV : 100 à 300 µM
Distribution (ratio tissu/plasma)	LCR (0,5), vésicules, sécrétions cervicovaginales, salive, placenta +++, mais variable		NR		LCR : 0,2 à 0,7 Rétine et humeur aqueuse : 1		LCR : < 0,01	LCR : 0,7
Liaisons PP	10 à 15 %		< 20 %		1 à 2 %		< 10 %	15 %
T 1/2 pl	3 heures		2 heures		2 à 4 heures		2,2 heures	2 à 4 heures
T1/2 ic (Δ triP)	1 heure		10 h (HSV 1) ; 20 h (HSV 2) ; 9 à 14 h (VZV)		> 24 heures		NR	NA
Métabolisme	Faible (15 %)		Faible (10 %)		Négligeable		Faible (10 à 20 %)	Négligeable
Élimination	Rénale (70 à 99 %)		Rénale (90 %)		Rénale (> 90 %)		Rénale (80 à 100 %)	Rénale (80 %)
Ajustement posologique	Cl cr < 50 mL/min	Cl cr < 75 mL/min	—	Cl cr < 40 mL/min	Cl cr < 50 mL/min (voie IV) ; < 60 mL/min (voie *per os*)		Cl cr < 55 mL/min	Cl cr < 1,6 mL/kg/min

NR : non renseigné ; NA : non applicable

■ *Infections à CMV*

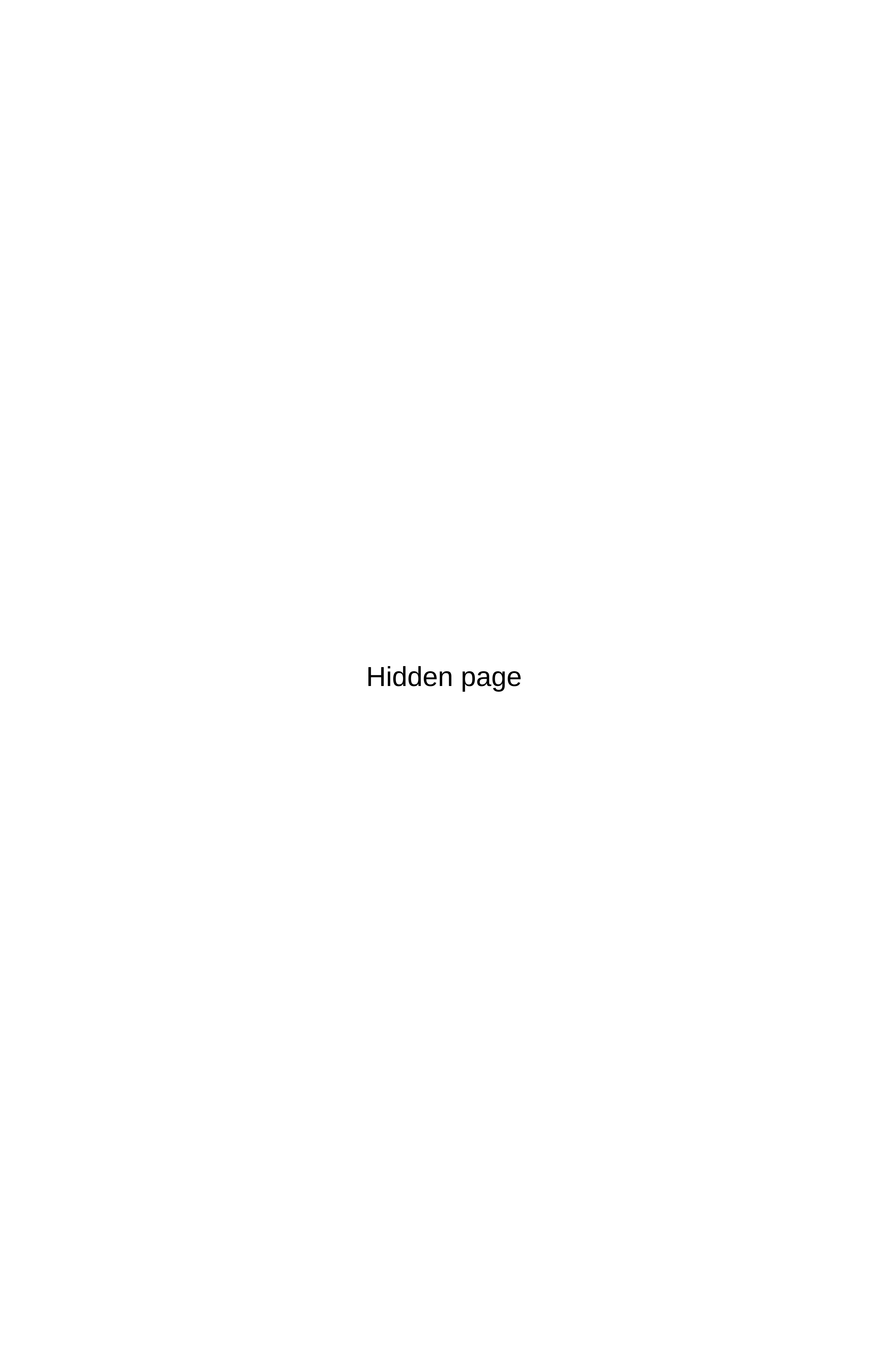
Prévention des infections à CMV, après greffe d'organe, notamment du rein, à l'exclusion de la greffe de poumon, à la dose de 2 000 mg, 4 fois par jour, le plus tôt possible après la greffe, pendant 90 jours.
La posologie du valaciclovir doit être adaptée chez les insuffisants rénaux, notamment pour les doses les plus élevées, dans la prévention des infections à CMV, pour des clairances rénales < 75 mL/min.

c) Famciclovir

Prodrogue du penciclovir (Oravir® comprimé 500 mg), il est indiqué dans la prévention de la douleur du zona chez les personnes de plus de 50 ans en situation d'immunocompétence ainsi qu'en cas de complications oculaires du zona dans les 72 heures de l'apparition des symptômes. Les doses sont de 500 mg, 3 fois par jour, 7 jours.
La posologie du famciclovir doit être adaptée chez les insuffisants rénaux, pour des clairances rénales < 40 mL/min.

d) Médicaments anti-CMV : ganciclovir, valganciclovir, foscarnet et cidofovir

Ces 4 médicaments sont indiqués pour les infections à CMV ; ils diffèrent sensiblement sur les intitulés.
Le *ganciclovir IV* a les indications les plus larges, étant utilisable aussi bien dans le cadre de l'infection par le VIH que dans le cadre de la transplantation d'organe et de moelle, dans le traitement d'attaque et d'entretien des infections disséminées à CMV (rétinienne, digestive, pulmonaire, encéphalique) à raison de 5 mg/kg, 2 fois/j pendant 15 à 21 jours en attaque, 1 fois/j en entretien ; de plus, il est préconisé dans le traitement précoce à des infections à CMV, chez les greffés de moelle osseuse et en traitement prophylactique après greffe d'organe (cœur notamment) en cas de traitement immunosuppresseur important.
La prodrogue du ganciclovir, le *valganciclovir*, est indiquée en traitement d'attaque (900 mg, 2 fois/j) et d'entretien (900 mg, 1 fois/j) des rétinites à CMV, dans l'infection par le VIH, et en traitement prophylactique des infections à CMV chez les patients CMV-négatifs bénéficiant d'une greffe solide à partir d'un donneur CMV-positif, à la dose de 900 mg, 1 fois/j, à débuter dans les 10 jours suivant la transplantation et à continuer jusqu'à 100 jours après celle-ci.
Le *foscarnet* a deux indications : l'une dans les infections disséminées à CMV (rétinienne, digestive, pulmonaire, encéphalique), dans le cadre de l'infection à VIH, en traitement d'attaque (180 mg/kg en 2 perf/j pendant 14 à 21 jours) et d'entretien (1 perfusion journalière de 90 à 120 mg/kg) ; l'autre indication, réservée aux immunodéprimés, est le traitement d'attaque des infections mucocutanées à HSV, en cas de résistance à l'aciclovir (80 à 120 mg/kg en 2 perfusions jusqu'à cicatrisation).
Le *cidofovir* est utilisable dans les rétinites à CMV, au cours du Sida, aussi bien en traitement d'attaque que d'entretien (5 mg/kg en perfusion IV, à J1, J8, J15, puis toutes les 2 semaines). Avec une tolérance rénale médiocre, ses modalités d'administration sont particulières et sont décrites ci-dessus.
Les doses de tous ces principes actifs doivent être adaptés à la fonction rénale.


Hidden page

Outre les plus répandus et les plus connus, (virus de l'hépatite B (VHB), virus de l'hépatite C (VHC)), pour lesquels il existe des traitements détaillés ci-dessous, citons :

- le virus de l'hépatite A (VHA), pour lequel il n'existe qu'un traitement préventif par des vaccins (Havrix®, Avaxim®, Twinrix® (VHA + VHB)), Tyavax® (VHA + typhoïde) et des immunoglobulines polyvalentes ;
- le virus de l'hépatite Delta (VHD), co-infectant le foie avec le VHB, et pour lequel les traitements sont quasi inexistants (essais avec l'interféron alpha) ;
- le virus de l'hépatite E (VHE), pour lequel des essais de vaccins sont en cours d'évaluation ;
- le cytomégalovirus (CMV), à l'origine d'hépatite granulomateuse (pas de traitement validé) ;
- les autres virus susceptibles d'être en cause, EBV, HSV 1 et 2, HHV6, VZV, cocksackie-échovirus, adénovirus, arbovirus (fièvre jaune, dengue, Lassa, Marburg, Ebola), pour lesquels les traitements seront à la fois symptomatiques et spécifiques si possible.

1. Traitements des hépatites B et C

Bien que n'appartenant pas du tout à la même famille virale (VHB, *Hepadnaviridae*, virus à ADN bicathénaire à enveloppe complexe présente dans le sang sous forme des particules de Dane ; VHC, *Flaviviridae*, virus à ARN monocathénaire enveloppé), les manifestations pathologiques et leurs conséquences sont similaires.

Les traitements préventifs concernent uniquement l'hépatite B, grâce à des vaccins (Engérix B®, GenHevac B®, HBVax PRO®), Twinrix® (VHA + VHB), Infanrix-hexa® (*Haemophilus influenza* b + diphtérie + tétanos + coqueluche + polyomyélite + hépatite B) et des immunoglobulines commercialisées (IVhebex®) dans l'indication de prévention de récidive après transplantation hépatique chez des patients porteurs de l'antigène de surface de l'hépatite B.

Les traitements curatifs de ces 2 hépatites (B et C) font appel tous deux à l'interféron α ; les autres molécules sont des analogues nucléosidiques dont les associations entre eux et avec l'interféron α représentent de grands espoirs de rémission à long terme, voire de guérison.

Les principes actifs autorisés pour le traitement des hépatites B et C sont au nombre de 5 ; la vidarabine a été retirée du marché et l'entécavir (Baraclude®) vient d'être commercialisé en 2006 ; d'autres molécules telles que le ténofovir, l'emtricitabine, sont actives sur le virus de l'hépatite B, mais n'ont pas l'AMM ; le penciclovir et le famciclovir, le lobucavir (BMS), les L-déoxynucléosides, les fluoronucléosides (le FIAU (fialuridine), le L-FMAU (Triangle)...) sont toujours en cours d'évaluation dans le traitement de l'hépatite B. Pour l'hépatite C, de nombreux principes actifs sont en développement, dérivés de la ribavirine, antiprotéases (Anti-NS3-4A (SCH-503034, Vx-950, BILN-2061), antihélicases et antipolymérases.

Les présentations figurent dans le *tableau* 7 ci-après (Vidal 2006).

2. Propriétés physico-chimiques

Hormis les interférons α, les autres molécules actives sur les VHB et VHC sont des inhibiteurs des enzymes de transcription du génome viral ; ce sont des analogues nucléosidiques de la cytosine tels que la lamivudine (3TC), de la guanosine tels que la ribavirine (RBV) et l'entécavir (ETV) ou encore des analogues nucléotidiques de l'adénosine tels que l'adéfovir (ADF) ; ce dernier composé est donc monophosphorylé d'emblée.
Les interférons α sont des cytokines protéiques d'origine naturelle caractérisées pour leurs propriétés antivirales, immunomodulatrices et antiprolifératives. Leurs utilisations dans la thérapeutique antivirale sont anciennes et remontent à 1987, dans le cadre de la recherche d'une efficacité anti-VIH ; les interférons α disponibles et commercialisés ne sont pas glycosylés et sont produits par génie génétique, par des cellules d'origine bactérienne ; les interférons alpha 2a et 2b produits à partir de *E. coli* modifié, ils sont dits « rbe » pour signifier leur origine bactérienne. L'interféron alfacon1 est une protéine dont la séquence de 166 acides aminés est dite « consensus » car issue des codons de 14 interférons naturels, insérés dans l'ADN d'*E. coli*, puis clonée pour produire l'interféron.
Les interférons alpha sont donc des molécules fragiles dans des conditions de températures propres à dénaturer les protéines ; leur conservation se fait donc préférentiellement entre 2 et 8 °C ; leur sensibilité au pH acide ou alcalin rend leur administration orale impossible.

3. Propriétés pharmacologiques et mécanisme d'action

Le mécanisme d'action antiviral des interférons alpha varie selon les cellules et les virus ; se fixant sur un récepteur cellulaire spécifique, ils induisent la synthèse de nombreuses protéines qui renforcent la résistance aux virus, notamment en interférant avec leur pénétration cellulaire, leur décapsidation, la synthèse de l'ARN messager, la translation en protéines virales et/ou avec l'assemblage et la libération des particules néoformées.
Ainsi sont induites par l'interféron la production de la 2'-5'-oligoadénylate [2-5(A)] synthétase et d'une protéine kinase ; ces 2 enzymes peuvent inhiber la synthèse protéique en présence d'ARN double-brin ; la [2-5(A)] synthétase produisant des oligomères adényliques qui activent une endoribonucléase cellulaire qui clive l'ARN viral et cellulaire ; une phosphodiestérase également induite par l'interféron clive une partie de l'ARN de transfert, bloquant l'élongation du peptide ; un virus donné peut subir plusieurs types d'inhibitions ; inversement, certains virus peuvent inhiber les effets de l'interféron. Ce dernier exerce également une activité immunomodulatrice, permettant une synergie efficace de lutte sur la pathologie infectieuse.
Les interférons alpha sont actifs non seulement sur les VHB et les VHC, mais ils exercent aussi une inhibition intéressante sur les papillomavirus (condylomes acuminés), les *Herpesviridae* (HSV, VZV, CMV, HHV8), et *in vitro* sur les VRS et les adénovirus.
Après mono et biphosphorylation cellulaire, les analogues nucléotidiques, *vidarabine et adéfovir*, inhibent l'ADN polymérase viral par compétition directe avec le

substrat naturel (désoxyadénosine triphosphate), provoquant la terminaison de la chaîne d'ADN du VHB. L'adéfovir inhibe sélectivement les polymérases virales à des concentrations plus faibles que celles nécessaires pour inhiber les polymérases α, β et γ d'ADN humain. Aussi bien l'adéfovir que la vidarabine sont actifs *in vitro* sur les herpèsvirus et les hépadnavirus. De plus, l'adéfovir est actif sur les rétrovirus et la vidarabine sur les poxvirus. Néanmoins, la vidarabine n'est plus utilisée en 2006.

La lamivudine, l'entécavir et la ribavirine subissent une mono, une bi puis une triphosphorylation intracellulaire.

La *lamivudine*, analogue de la cytosine, est transformée en triphosphate dans l'hépatocyte, puis l'incorporation dans l'ADN du VHB bloque l'activité de sa reverse transcriptase et de son ADN polymérase, ayant pour conséquence un arrêt de la réplication virale. La lamivudine n'aurait qu'une faible affinité pour les ADN polymérases α et β des cellules mammifères, ainsi que pour l'ADN polymérase γ des mitochondries.

L'*entécavir*, analogue de la guanosine, une fois triphosphorylé, inhibe les 3 fonctions de la polymérase du VHB, amorce de la polymérase, transcription inverse de l'ADN à partir de l'ARN messager, et synthèse du brin positif d'ADN. L'entécavir serait un faible inhibiteur des ADN polymérases cellulaires (α, β, δ) et n'aurait que peu d'impact sur la synthèse des polymérases γ ou de l'ADN mitochondrial des hépatocytes.

La *ribavirine*, également analogue de la guanosine, triphosphorylée, a plusieurs sites d'action, de telle sorte que le dérivé monophosphorylé inhibe compétitivement l'inosine-5'-phosphate déshydrogénase cellulaire et interfère avec la synthèse de la guanosine triphosphate, et donc avec celle des acides nucléiques, notamment l'amorçage de l'ARN messager viral par exemple ; néanmoins, il est montré que la ribavirine seule n'est pas efficace sur le virus de l'hépatite C mais seulement associée à l'interféron alpha ; l'explication de cette synergie n'est pas élucidée.

En revanche, la ribavirine inhibe *in vitro* la réplication d'un large spectre de virus à ARN et ADN (orthomyxo, paramyxo aréna, bunya, herpès, adéna, pox et rétrovirus). D'ailleurs, elle est utilisée en thérapeutique par aérosol dans les infections à virus syncytial (VRS) et dans les infections à arénavirus (fièvre de Lassa), par voie injectable. Dans ces 2 cas, la ribavirine est obtenue par Autorisation temporaire d'utilisation nominative, à l'AFSSAPS.

4. Phénomènes de résistance

Lors de l'utilisation de toutes ces molécules, les phénomènes de résistance sont possibles, notamment avec la lamivudine vis-à-vis du VHB ; la mise à disposition de l'entécavir permettra peut-être, grâce à l'association de plusieurs antiviraux à terme, de limiter ces émergences très préjudiciables ; en ce qui concerne la ribavirine, son association avec l'interféron alpha ne semble pas, à ce jour, favoriser l'apparition de résistances des virus VHC, mais il existe néanmoins des sensibilités variables selon les différents génotypes.

sous-cutané, 3 fois par semaine pendant 4 à 6 mois ; les doses peuvent être adaptées selon la tolérance hématologique du patient ; si après 3 à 4 mois de traitement, il n'y a pas d'amélioration, l'arrêt du traitement doit être envisagé. Intergen® n'a pas d'indication dans l'hépatite B. L'utilisation de l'interféron α pegylé (Pégasys®) à la dose de 180 mg/semaine a été évaluée et a fait l'objet d'une AMM. L'observance et l'efficacité vont être très certainement améliorées.

- Lamivudine
  Les doses de Zeffix® (3TC) sont de 100 mg une fois par jour, à prendre avec ou sans nourriture ; chez les patients Hbe positifs, le traitement doit durer jusqu'à la séroconversion confirmée des Ag Hbe en AC anti-Hbe ; si ce n'est pas le cas, le traitement sera arrêté ; en cas de résistance et/ou de perte d'efficacité, il faudra de même arrêter le traitement. Les pourcentages de résistance rapportés sont de 40 %.
- Adéfovir
  L'adéfovir (Hepséra®) est efficace aussi bien chez les patients immunocompétents (ADN du VHB > 10^5 copies/mL et ALAT > 1,2 fois la normale et score de fibrose ≥ 2 ou score d'activité Métavir égal à 3 à la ponction biopsie hépatique), que co-infectés VIH-VHB (ADN du VHB > 10^5 copies/mL et score de fibrose ≥ 2 ou score d'activité Métavir ≥ 2). La dose d'adéfovir est de 10 mg (1 comprimé) 1 fois par jour, avec ou sans nourriture. Il y a déjà des résistances évaluées de 15 à 20 % après 4 ans d'utilisation.
- Entécavir
  Commercialisé en 2006 (Baraclude®), l'entécavir est indiqué aussi bien chez le patient naïf (0,5 mg/j) qu'en cas de résistance à la lamivudine (dose augmentée à 1 mg/j). Il présenterait un pourcentage de résistances très faible.

Chez les patients co-infectés, il est préférable de prescrire une molécule active sur le VIH et le VHB, à dose efficace sur l'un et l'autre virus (lamivudine, emtricitabine, ténofovir), et éviter la prescription d'adéfovir ou de lamivudine à doses infrathérapeutiques pour le VIH. Actuellement, ni l'emtricitabine, ni le ténofovir, ni leur association n'ont d'AMM pour l'hépatite B.
Des essais d'associations de nucléosides (adéfovir, lamivudine, et/ou interféron alpha ou autres médicaments) sont en cours mais ne peuvent actuellement être recommandés.

b) Hépatite C

Un consensus français, en février 2002, a précisé les indications des traitements pour une prise en charge optimale de l'hépatite C. Un consensus européen en mars 2005 a détaillé les meilleures conditions de traitement des patients co-infectés par le VHC et le VIH ou le VHB et le VIH.
Les recommandations 2002 sont les suivantes. Sachant que la sévérité de l'hépatite C est liée principalement à la fibrose hépatique, (F), les experts considèrent que le traitement doit être entrepris dans les cas suivants :

- hépatite chronique modérée ou sévère (score Métavir F2 ou F3) ;
- hépatite avec cirrhose (score Métavir F4), sauf en cas de cirrhose décompensée ;
- hépatite chronique minime (score Métavir F0 ou F1) avec facteurs aggravants (obésité, consommation excessive d'alcool, co-infection VHC/VIH) ;
- hépatite chronique dans un contexte de toxicomanie stabilisée associée à des facteurs de gravité (consommation d'alcool, co-infection VIH/VHC et/ou VIH/VHB/

VHC, troubles psychiatriques et facteurs de fragilité sociale) ; *en revanche, le virus de l'hépatite C de génotype 3, majoritairement retrouvé chez les personnes toxicomanes, n'entraîne pas un traitement systématique* ;
- hépatite associée à des troubles psychiatriques stabilisés en ayant pesé les bénéfices et les risques de décompensation psychologique, conséquences des effets indésirables dépressifs attribués à l'interféron alpha.

Concernant les patients co-infectés, les recommandations 2005 renforcent celles de 2002 : le traitement anti-VHC doit être envisagé chez *tous* patients co-infectés VIH-VHC (lorsque bénéfice > risque), notamment chez les patients toxicomanes substitués, sans différer la prise en charge, en assurant un soutien psychologique et social ; pour les personnes toxicomanes actives, la décision est prise au cas par cas. Pour les patients avec des troubles psychiatriques, l'IFN α peut révéler ou aggraver une dépression pouvant conduire à différer le traitement anti-VHC. En cas de troubles psychiatriques légers, il ne faut pas différer le traitement et proposer un soutien.

Le traitement est indiqué selon l'appréciation de l'urgence à traiter en priorité le VHC ou le VIH, en prenant en compte les interactions de la ribavirine avec les analogues nucléosidiques antirétroviraux.

Si le traitement pour le VIH n'est pas nécessaire, le traitement anti-VHC est recommandé. Si le taux de CD4 est < $200/mm^3$, il faut débuter les antirétroviraux avant d'initier un traitement anti-VHC.

Le traitement de choix est l'association Peg-IFN α (Peg-IFN α 2a = 180 µg/semaine, ou Peg-IFN α 2b = 1,5 µg/kg/semaine) et la ribavirine dont les doses varient selon le génotype (G 1 et 4 avec ARN VHC élevé : 1 000 à 1 200 mg/j (15 mg/kg)) ; pour tous les autres génotypes (G 2 et 3 ou G 1 avec ARN VHC faible : 800 mg/j) ; la durée de traitement, quel que soit le génotype, est de 48 semaines. Pour le génotype 1, une durée de 72 semaines est possible. Pour les patients co-infectés, la dose de ribavirine est de 800 mg/j mais elle peut être adaptée selon le poids et la tolérance.

Les schémas de traitement en monothérapie d'interféron alpha standard et en bithérapie d'interféron alpha et de ribavirine sont décrits dans les libellés d'AMM mais ne sont plus guère utilisés en 2006 ; les injections se font 3 fois par semaine en sous-cutané, à raison de 3 à 4,5 MUI par injection.

La ribavirine doit se prendre en 2 prises par jour avec de la nourriture, afin de favoriser son absorption.

L'interféron pégylé se présente sous forme de solution ou de poudre à reconstituer avec un solvant ; l'administration est faite en sous-cutanée, une fois par semaine, tous les 7 jours.

En cas de contre-indication à la ribavirine, ou en traitement d'entretien s'il n'y a pas de réponse virologique : la dose d'IFN PEG α-2b est de 1 µg/kg/semaine seul ou d'IFN PEG α-2a de 180 µg/semaine seul, 48 semaines en cas d'intolérance à la ribavirine, ou selon la réponse et la tolérance.

Les experts de la Conférence de consensus 2002 recommandaient l'utilisation de l'interféron alpha standard en monothérapie dans les cas de primo-infection par le VHC (hors AMM) à raison de :

IFNα 5 MUI/j pendant 4 semaines, puis 5 MUI 3 fois/semaine pendant 20 semaines ou IFNα 10 MUI/j jusqu'à normalisation des transaminases.

Cette primo-infection peut survenir dans le cadre d'un accident exposant au sang chez un soignant, ou dans le cadre d'une hépatite C aiguë ictérique. Dans ces cas, l'interféron Peg-IFN α est aussi mentionné dans les recommandations 2005.
Chez les dialysés, l'interféron α pégylé et la ribavirine étant contre-indiqués, c'est l'interféron α standard qui est préconisé à raison de 3 MUI 3 fois par semaine pendant 6 à 12 mois ; les injections sont faites en fin de dialyse.
La place de l'interféron « consensus » (interféron alfacon-1) n'est pas précisément déterminée. L'absence d'activité prolongée le rend moins pratique.

7. Effets indésirables

Tableau 9. Effets indsésirables des antiviraux actifs sur les virus des hépatites B et C

	Interféron α	Ribavirine	Lamivudine	Adéfovir	Entécavir
Troubles digestifs et hépatiques	Nausées, anorexie (fréquent) vomissements, diarrhées, selles molles ; altération du goût ↑ ALAT/ASAT	Nausées, vomissements, dyspepsie, douleurs abdominales, diarrhées, anorexie	Nausées, dyspepsies, gêne abdominale, vomissements (rare) ↑ ALAT/ASAT	Nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées	Nausées
Troubles allergiques et/ou réactions locales	Rash, alopécie, œdème de la face, hypersensibilité, anaphylaxie ; Douleurs au point d'injection	Prurit, urticaire, rash, peau sèche	Rash cutané (rare)	Prurit	
Troubles généraux et neurologiques	– Syndrome pseudo grippal : fièvre, céphalées, fatigue, frissons, myalgies (doses-dépendants) – Perte de poids, somnolence, douleur, neuropathies, arthralgies, vertiges, hypotension, paresthésies	Insomnies, irritabilité, perte de poids	Céphalées, asthénie	Céphalées, syndrome pseudo-grippal, insomnie, paresthésies	Céphalées (9 %) Fatigue (6 %) Vertiges (4 %), sensation de malaise (3 %)
Toxicité rénale	Insuffisance rénale, rarement syndrome néphrotique, augmentation de la créatinine et urée			Importante à doses > 30 mg ↑ créatininémie, hypophosphatémie	
Troubles hématologiques	Hémorragies ou occlusions rétiniennes, épistaxis, gingivorragies, granucytopénie, thrombopénies, anémie	Anémie (15 %), neutropénie	Neutropénie, thrombopénie, anémie (rare)	Neutropénie, thrombopénie, anémie	
Troubles pulmonaires et cardio-vasculaires	– Pneumopathies inflammatoires, infiltrat pulmonaire, toux, pharyngite, dyspnées – Tachycardies, hypertension ou hypotension, troubles du rythme, cardiomyopathies	Dyspnée, pharyngite	Gêne de la gorge et amygdales, infections respiratoires		
Troubles de l'humeur ou psychiatriques Troubles endocriniens et/ou cellulaires	Malaise, dépression tentative de suicide, irritabilité, nervosité, troubles de la concentration, insomnie. Augmentation de l'appétit, baisse de la libido ; hyper ou hypothyroïdie, hyperglycémie, aggravation d'un diabète		Acidose lactique, hépatomégalie, stéatose hépatique, atteintes mitochondriales	Toxicité fœtale Toxicité mitochondriale : acidose lactique	Toxicité mitochondriale : acidose lactique

continents ont publié des recommandations depuis 2004 pour anticiper une éventuelle survenue d'une pandémie grippale avec un virus mutant qui serait issu du virus aviaire.

2. Antiviraux actifs sur le virus syncytial

Deux principes actifs sont disponibles pour le traitement des infections à VRS : la ribavirine (Virazole®) et le palivizumab (Synagis®).

- La ribavirine, dans cette indication, est en ATU nominative et s'utilise par voie pulmonaire, en aérosol, chez les enfants et les adultes immunodéprimés ; la dose est de 0,8 mg/kg/h, pendant 12 à 18 heures chaque jour, pendant 3 à 7 jours, en association avec de l'oxygène. La ribavirine est hématotoxique, provoquant une diminution de l'hémoglobine, une asthénie, voire une hépatotoxicité.
- Le palivizumab (en poudre lyophilisée 100 et 500 mg) est un anticorps monoclonal humanisé de type IgG_{1K}, dirigé contre un épitope du site antigénique A de la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial (VRS). Il est réservé aux enfants prématurés de 6 à 24 mois dans la prévention des infections respiratoires basses graves à VRS, à la dose de 15 mg/kg, en IM, une fois par mois, pendant la saison épidémique. Les effets indésirables sont principalement une fièvre, des réactions au point d'injection, des manifestations de nervosité, plus rarement des infections respiratoires hautes, des rhinites, une toux, une leucopénie, des diarrhées et des vomissements. Ce médicament est réservé au circuit hospitalier (prescription et dispensation).

D. Médicaments antirétroviraux

La famille des médicaments actifs sur les virus de l'immunodéficience humaine (VIH 1 et 2), constitue une classe relativement homogène, d'un point de vue chimique et d'un point de vue pharmacologique ; d'une certaine manière, les profils de toxicité, notamment des inhibiteurs de la protéase virale, sont également similaires.

Cette famille se caractérise par sa nouveauté (premier antirétroviral en 1987, la zidovudine, AZT), son évolutivité actuelle (de nombreux principes actifs sont en cours de développement en 2007 pour les 10 années à venir) et par la recherche et la mise au point permanente de stratégies thérapeutiques optimales, associant nécessairement au moins 3 antirétroviraux.

Par conséquent, les données figurant ci-dessous sont un état des lieux daté (2^d^ semestre 2006), que le lecteur devra actualiser au fur et à mesure de la mise à disposition de nouvelles molécules et recommandations par la consultation du rapport 2006, sous la direction du Pr. Yeni P. décrivant les recommandations du groupe d'experts pour la *Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH*, éditions Médecine-Sciences, Flammarion.

Les médicaments antirétroviraux sont des principes actifs inhibant la réplication virale ; ils ne sont pas virucides. Ils bloquent l'une ou l'autre étape du cycle de réplication virale en agissant sur une ou plusieurs enzymes nécessaires aux virus, notamment la reverse transcriptase et la protéase. Des nouvelles molécules sont

déjà en phase clinique, visant à inhiber d'autres enzymes du cycle de réplication (par exemple l'intégrase) ou à bloquer des récepteurs spécifiques permettant la pénétration des virus dans la cellule hôte ou son noyau (inhibiteurs d'entrée, de fusion, anti-CCR5, anti-CXCR4), voir figure ci-dessous.

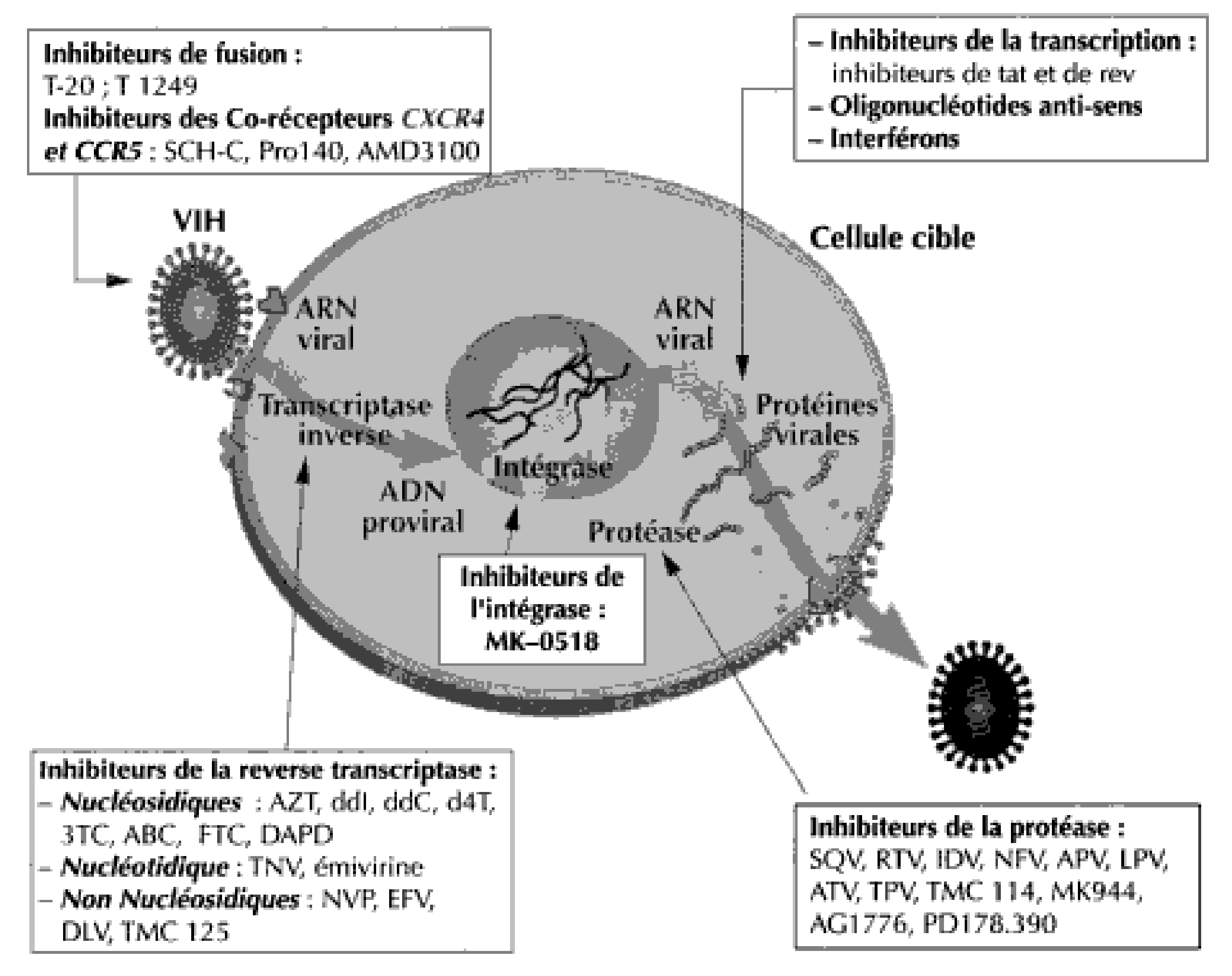


Figure 1. Schéma des sites d'action des antirétroviraux disponibles en 2007 ou en cours de développement

Les antirétroviraux commercialisés sont décrits dans le *tableau 10*.
De nombreux principes actifs sont en essais cliniques de phases 2 et 3 :
- inhibiteurs non nucléosidiques de la RT : TMC 125 (etravirine), TMC 278 (rilpivirine) ;
- inhibiteurs de la protéase : GW640385 (brécanavir) ;
- inhibiteurs des récepteurs CCR5 (anti-CCR5) : maraviroc, vicriviroc ;
- inhibiteurs des récepteurs CXCR4 (anti-CXCR4) ;
- inhibiteurs d'entrée (anticorps anti-CD4) : TNX-355 ;
- inhibiteurs de l'intégrase : MK-0518 (raltégravir), GS-9137 ;
- inhibiteurs de maturation : PA-457.

1. Propriétés physico-chimiques et mécanismes d'action

a) Antirétroviraux inhibiteurs de la reverse transcriptase (IRT)

Ils comprennent les analogues nucléosidiques (INRT), les analogues nucléotidiques et les non nucléosidiques (INNRT).
Les INRT sont tous des didéoxynucléosides, (ddN), c'est-à-dire des bases pyrimidiques (cytosine (C), uracile (U) et thymine (T)) et puriques (adénine (A), guanine (G)), constitutives des acides nucléiques, liées par une liaison N-C ou C-C à un résidu sucre osidique (β-D-ribo-furanose ou β-D-désoxyribofuranose).

Tableau 11. Bases analogues des antirétroviraux nucléosiques et nucléotidiques inhibiteurs de la reverse transcriptase

Base analogue	Inhibiteur nucléosidique ou nucléotidique	Formule
Thymidine et uridine	Zidovudine (AZT)	3'-azido-2', 3'-didésoxy**thymidine**
	Stavudine (d4T)	2', 3'-didéhydro-2',3'-didésoxy**thymidine**
Cytidine	Lamivudine (3TC)	2', 3'-didésoxy-3'-thia**cytidine**
	Zalcitabine (ddC)	*2', 3'-didésoxy***cytidine**
	Emtricitabine (FTC)	2', 3'-didésoxy-5-fluoro-3'-thia**cytidine**
Adénosine et inosine	Didanosine (ddI)	2', 3'-didésoxy**inosine**
	Ténofovir (TDF)	Phosphinyl-méthoxy-propyl-**adénine**disoproxil fumarate
Guanosine	Abacavir (ABC)	(1S, cis)-4-(2-amino-6-(cyclo-propylamino)-9H-**purine**-9-yl)-2-cyclopentène-1-methanol sulfate

Les nucléosides et les nucléotides jouant un grand rôle dans les métabolismes cellulaires, leurs mécanismes d'action découlent de leurs structures chimiques apparentées aux bases naturelles, au niveau des acides ribo (ARN) et désoxyribonucléiques (ADN). Sous le contrôle de certaines enzymes, polymérases cellulaires et virales, comme la reverse transcriptase (RT), les macromolécules vont se constituer.
La reverse transcriptase est une ADN polymérase ARN-dépendante dont le rôle est de transcrire, après pénétration du virus dans la cellule, l'ARN génomique viral en un double-brin d'ADN proviral ; cette enzyme représente une cible d'autant plus intéressante dans la lutte contre le VIH qu'elle est absente chez l'homme et caractéristique des rétrovirus. Néanmoins, sa configuration est proche de celles des polymérases à ADN de la cellule hôte ; par conséquent, certains principes actifs peuvent inactiver les polymérases α, β et γ de la cellule et des mitochondries, à l'origine des toxicités de ces médicaments.
Les INRT, après triphosphorylation par une kinase sur le groupement OH en 5' de l'ose (donc indispensable à leur activation), sont capables d'inhiber la fonction polymérasique de la RT à la place des précurseurs triphosphates naturels intracellulaires. La première étape de phosphorylation est une étape limitante car elle dépend de la nature du nucléoside utilisé, du type de cellules infectées, de leur activation ou de leur quiescence, du cycle cellulaire, de la durée du traitement, du potentiel de phosphorylation des différentes enzymes intervenant, qui sont de nature différente (thymidine kinase (TK1, TK2) pour l'AZT et la d4T, nucléotidase pour la ddI, désoxycytidine kinase pour la ddC et la 3TC, etc.). C'est pour toutes ces raisons

qu'il est difficile de prévoir très précisément la réponse aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* d'une exposition de cellules infectées à ces molécules. L'association de ces nucléotides peut être synergique, additive ou antagoniste ; ainsi en est-il pour l'antagonisme *in vitro* et *in vivo* de l'AZT et de la d4T, le premier inhibant la phosphorylation du second ; c'est une association qui n'est donc pas prescrite en clinique.
Afin de mieux comprendre et contrôler l'inhibition de la RT par les INRT triphosphorylés, il apparaît indispensable de mesurer la concentration de ces derniers dans les milieux intracellulaires ; ces dosages, techniquement difficiles, sont en cours de développement ; ils vont permettre d'optimiser les schémas de traitement et de limiter les toxicités.
Quant aux inhibiteurs non nucléosidiques, ils ont des structures chimiques ne présentant pas des parentés chimiques homogènes.
La *névirapine* est une diazépine (11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4-méthyl-6H-dipyrido(3,2-b :2',3'-e)(1,4) diazépine-6-one.
L'*éfavirenz* est une benzoxazine : (S)-6-chloro-4-(cyclopropyléthynyl)-1,4-dihydro-4(trifluorométhyl)-2H-3,1-benzoxazine-2-one ; il porte 4 atomes d'halogène (3 fluors et 1 chlore), et une fonction cyclopropyléthynyle lui conférant une solubilité presque nulle dans l'eau à température ambiante. Son coefficient de partage est donc particulièrement élevé, expliquant probablement en partie ses caractéristiques cinétiques et sa toxicité.
Enfin, la *delavirdine* fait partie des arylpipérazines (BHAP).
Les INNRT agissent sur un site différent de la reverse transcriptase, par rapport à celui des INRT ; ils se lient grâce à des liaisons hydrophobes ou des liaisons hydrogènes avec des acides aminés définis entourant une des poches formées par l'enzyme ; l'interaction avec la reverse transcriptase est très forte et très spécifique ; néanmoins si l'enzyme subit des mutations aux endroits d'attache des INNRT, des résistances apparaissent rapidement pour l'ensemble des molécules de cette famille. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de bloquer complètement la réplication virale, avec des concentrations élevées d'associations d'antirétroviraux, afin de prévenir l'apparition de ces résistances qui, une fois acquises, sont définitives.

b) Inhibiteurs de la protéase (IP)

La protéase virale est indispensable à la survie du VIH pour la maturation des enzymes virales et des protéines structurales constituant la capside ; les polyprotéines virales Gag (p55) et Gag-Pol (p160), produites au cours du cycle cellulaire du virus, s'assemblent dans le cytoplasme conduisant au virion immature par bourgeonnement ; l'autoclivage nécessaire de la polyprotéine, par la protéase virale, est consécutif à la dimérisation de la p160, puis clivage spécifique en protéines virales, protéine de la matrice (p17), protéine de la capside, (p24), de la nucléocapside, (p7 et p6), protéines enzymatiques telles que la reverse transcriptase, (p51/p66), l'intégrase (p34) et la protéase elle-même (p11).
La protéase participe donc à la transformation des particules immatures virales en particules infectieuses. Son inhibition constitue ainsi une cible privilégiée pour limiter l'extension de l'infectiosité virale. Cette protéase activée est dimérique, constituée de 2 monomères de 99 acides aminés, arrangés de manière symétrique ; le site actif de la protéase est à la jonction des 2 monomères et reconnaît 12 sites de coupure ; ces derniers peuvent être mutés chez les patients multirésistants.

La première génération des inhibiteurs de la protéase consiste à mimer le substrat de l'enzyme par des peptides courts dans lesquels la liaison scissile est remplacée par un groupe non clivable, bloquant le fonctionnement de l'enzyme. Le saquinavir, le ritonavir, l'indinavir, le nelfinavir et l'amprénavir sont des analogues de l'état de transition des substrats avec la protéase ; les 3 premiers IP cités sont encore peptidomimétiques tandis que les 2 derniers mentionnés ne sont pas peptidiques. Les IP de seconde génération sont censés inhiber les protéases mutantes produites sous l'effet du ritonavir, de l'indinavir et du saquinavir : il s'agit du lopinavir et de l'atazanavir, du palinavir, du tipranavir et du DMP 450 par exemple, qui ne sont pas peptidiques et susceptibles de présenter une meilleure biodisponibilité orale.
L'apparition de résistances à ces médicaments est liée à l'accumulation de mutations sur le gène de la protéase, d'autant que l'agent inhibiteur a exposé le virus à des concentrations insuffisantes, circonstance idéale pour l'émergence de virus résistants.

2. Pharmacocinétique des antirétroviraux

Les caractéristiques pharmacocinétiques des antirétroviraux doivent être décrites différemment selon la famille à laquelle ils appartiennent ; les INRT sont des prodrogues nécessitant une triphosphorylation afin d'être actifs sur les VIH ; les INNRT sont immédiatement actifs mais ils se démarquent par des demi-vies d'élimination dépassant les 20 heures et une capacité d'interactions avec les cytochromes P450 très importante, leur conférant des propriétés inductrices enzymatiques. Les inhibiteurs de la protéase (IP) partagent ces fortes affinités pour les cytochromes hépatiques en étant certes inducteurs enzymatiques pour partie, mais surtout de très puissants inhibiteurs enzymatiques des CYP 450 3A4, 1A2, 2D6, 2C9 et 2C19 ; ils sont ainsi à l'origine de très nombreuses interactions médicamenteuses potentielles, qui ont mobilisé les pharmacologues, les médecins, les pharmaciens.

a) Inhibiteurs de la reverse transcriptase

Tableau 12. Propriétés pharmacocinétiques des inhibiteurs de la reverse transcriptase (INRT et INNRT)

Sigle	BDP (%)	Tmax (h)	Cmax	LCR/sérum (%)	T1/2ic (h)	T1/2p (h)	Mtbl hépatique	Elim rénale (%)
ABC	75	1	3 µg/mL	30 à 44	21	0,8 à 1,5	66	≤ 5
ddI	40	1	4,5 µg/mL	21	15 à 20	1 à 2	50	50
3TC	80	1	1,5 à 1,9 µg/mL	12	10 à 15	2 à 3	5 à 10	80
FTC	90	1			39	9		80
d4T	80	1	0,5 à 1 µg/mL	39	3 à 5	1 à 1,5	80	80
AZT	60	1	1,2 µg/mL	50	3 à 5	1 à 1,5	60 à 80	20
TDF	40	2 à 3	213 à 375 ng/mL		≥ 60	14	Très faible	80
DLV	85	1	16 ± 9 µg/mL	0,4	5,8	NR	≥ 95	51
EFV	50	2 à 5	4,1 ± 1,2 µg/mL	0,26 à 1,2	40 à 55	50	99	≤ 1
NVP	90	4	6,5 ± 1,8 µg/mL	45	25 à 30	30	95	≤ 15

Tableau 16. Effets indésirables et tolérance des antirétroviraux INNRT

	Éfavirenz	Névirapine	Delavirdine
Troubles digestifs		Nausées	Nausées, diarrhées
Troubles allergiques	Éruptions cutanées, syndrome de Stevens-Johnson	Éruptions cutanées (rougeurs, prurit, rash), syndromes de Stevens-Johnson, et de Lyell, fièvre, ulcérations des muqueuses	*Rash maculo-papulaire fréquent, prurit, érythèmes, fièvre syndrome de Stevens-Johnson,*
Troubles neuro-psychiques	Sensations vertigineuses, insomnie, somnolence, troubles de la concentration, perturbations des rêves, réactions psychotiques surtout si antécédents psychiatriques ou toxicomanie, dépression sévère aiguë si antécédents dépressifs	Maux de tête, somnolence, fatigue	Maux de tête, fatigue
Troubles hématologiques		–	Anémie, neutropénie, thrombopénie
Toxicité hépatique et/ou pancréatique	↑ Transaminases	Hépatites cytolytiques graves, voire fulminantes, ↑ transaminases	↑ Transaminases et bilirubine
Autres	Dyslipidémies		

- Troubles des paramètres biologiques :
  - Transaminases hépatiques : augmentation (RTV = IDV > SQV > NFV) ;
  - Bilirubine : ATV > IDV ;
  - CPK augmentées : RTV > (myalgies) ;
  - Neutropénie : IDV = RTV > NFV ;
  - Anémie : RTV > ;
  - Troubles lipido-glucidiques : voir ci-dessous.
- Les troubles métaboliques glucidiques et digestifs (après plusieurs mois de traitement habituellement) : ces complications sont de plus en plus fréquentes, elles sont à l'origine des lipodystrophies et de l'augmentation du risque cardio-vasculaire.

Anomalies cliniques : lipodystrophies avec augmentation ou diminution du poids.

- Lipoatrophies : redistribution des graisses avec fonte adipeuse externe et/ou viscérale (amaigrissement des bras, des jambes, des fesses, perte des boules de Bichat, creusement du visage) ;
- Lipohypertrophies : accumulation des graisses sur le tronc (ventre et poitrine, gynécomastie) et plus rarement sur le cou (bosse de bison), lipomatoses.

Anomalies biologiques

- Diabète sucré avec intolérance au glucose et/ou résistance à l'insuline ; aggravation ou révélation d'un diabète préexistant ; hyperglycémie et hyperinsulinémie ;
- Hyperlipidémie avec augmentation des triglycérides et du LDL-cholestérol ; pancréatites ; risques d'atteintes artérielles dont coronariennes, cas d'athérosclérose et infarctus du myocarde ;
- Goutte.

de différer le traitement antirétroviral ou d'utiliser la rifabutine prescrite selon des schémas particuliers (150 mg × 3/semaine par exemple) en association avec les IP/r, sauf avec le nelfinavir (dose de rifabutine 150 à 300 mg × 2/semaine). En revanche, la rifabutine doit être augmentée à 450 mg/j en association à 600 mg d'éfavirenz, tandis qu'avec la névirapine, la dose reste à 300 mg/j.
Les antifongiques triazolés sont des inhibiteurs du CYP 3A4 ; l'itraconazole, le fluconazole et le voriconazole doivent être ajustés par des dosages plasmatiques concomitamment aux ARV. Le kétoconazole ne devrait plus être utilisé.
Les antiépileptiques représentent également une classe à risques d'interactions avec le phénobarbital, la phénytoïne, l'acide valproïque, la carbamazépine. La mesure des concentrations plasmatiques est indispensable.
Toutes les molécules métabolisées par les CYP 3A, notamment, doivent être soigneusement surveillées : les antipaludéens (quinine, halofanthrine), les hypolipidémiants de la famille des statines (préférer la pravastatine, la fluvastatine, voire la rosuvastatine), les immunosuppresseurs (tacrolimus, ciclosporine), les dérivés œstro-progestatifs.
L'atazanavir, mais aussi le saquinavir ne doivent pas être associés aux inhibiteurs de la pompe à protons (IPP).
Aucun ARV ne doit être pris avec les pansements gastriques (hydroxydes d'aluminium, de calcium et de magnésium), les argiles ou les charbons ; la prise, même à distance, expose au risque d'adsorption des principes actifs et donc à leur inefficacité par diminution de leur concentration plasmatique.
L'initiation, le suivi ou le diagnostic d'un échec de traitement ARV doivent être accompagnés par les dosages plasmatiques des antiviraux eux-mêmes et des molécules associées.

Principaux antitoxoplasmiques, antiprotozoaires intestinaux, anthelminthiques, avermectines

D. RICHARD, Pharmacie, centre hospitalier Henri Laborit, Poitiers.

I. Antitoxoplasmiques

La toxoplasmose est une atteinte granulomateuse généralisée ou cérébrale provoquée par *Toxoplasma gondii*. La maladie peut fréquemment se développer sur un mode asymptomatique et l'on estime, suivant les populations humaines, que 5 à 95 % des individus sont contaminés.

A. Rappel pathogénique

Le toxoplasme est un petit protozoaire intracellulaire obligatoire susceptible de contaminer tout animal homéotherme. Il boucle son cycle de reproduction asexuée dans les cellules. Il forme aussi des kystes tissulaires.
Sa reproduction sexuée semble n'avoir lieu que dans les cellules intestinales du chat, qui va rejeter dans ses selles des oocystes. La transmission s'effectue par voie transplacentaire, par ingestion de viande mal cuite contenant des kystes tissulaires, par ingestion de légumes contaminés par des oocystes (car cultivés dans un sol contenant des déjections de chat), par le contact avec des chats, par manque d'hygiène des mains et, très exceptionnellement, par iatrogène (greffe d'organes).

B. Rappel symptomatologique

- Toxoplasmose acquise. Son diagnostic est généralement purement sérologique. Néanmoins, dans certains cas, il sera possible d'observer une forme ganglionnaire évoquant une mononucléose, une infection disséminée foudroyante chez les sujets immunodéprimés, une forme chronicisée avec inflammation rétinienne et uvéite.
- Toxoplasmose congénitale néonatale. Résultant d'une transmission fœto-maternelle, elle est susceptible, si elle est très précoce, d'entraîner un avortement. Dans le cas contraire, l'enfant pourra naître en présentant des signes de la maladie, avec une atteinte parfois foudroyante et rapidement fatale, ou encore les symptômes n'apparaîtront que des mois après la naissance, avec troubles hépatiques et neurologiques.

C. Traitement de la toxoplasmose

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire et ses conditions de vie ont longtemps fait obstacle à une évaluation sérieuse des thérapeutiques susceptibles d'empêcher sa prolifération.

Toxoplasmose acquise

On s'abstient généralement de tout traitement (on peut administrer de la Rovamycine® – *cf. infra* – à un adulte atteint d'une simple forme ganglionnaire à raison de 3 g/j pendant 3 semaines, ou associer Malocide®, Adiazine® et acide folinique dans les formes graves) sauf dans deux cas bien spécifiques :
- la femme enceinte ;
- le sujet immunodéprimé et notamment le patient sidéen.

Dans ces deux cas, les mesures de prévention non médicamenteuses sont importantes. La prophylaxie est expliquée au patient lorsque sa sérologie est négative :

- éviter de consommer de la viande insuffisamment cuite ou congeler les aliments ;
- laver les légumes et jardiner avec des gants ;
- éviter le contact avec les chats et la terre potentiellement contaminée.

1. Femme enceinte et nouveau-né

La recherche de l'immunité antitoxoplasme est systématique et obligatoire chez toute femme enceinte, en France (décret de 1992) où plus de 50 % des femmes ne sont pas immunisées. La recherche doit être faite le plus précocement possible, si possible avant 8 semaines d'aménorrhée. Le risque de contamination fœtale augmente avec l'âge gestationnel pour atteindre 90 % à proximité du terme.

a) Produits

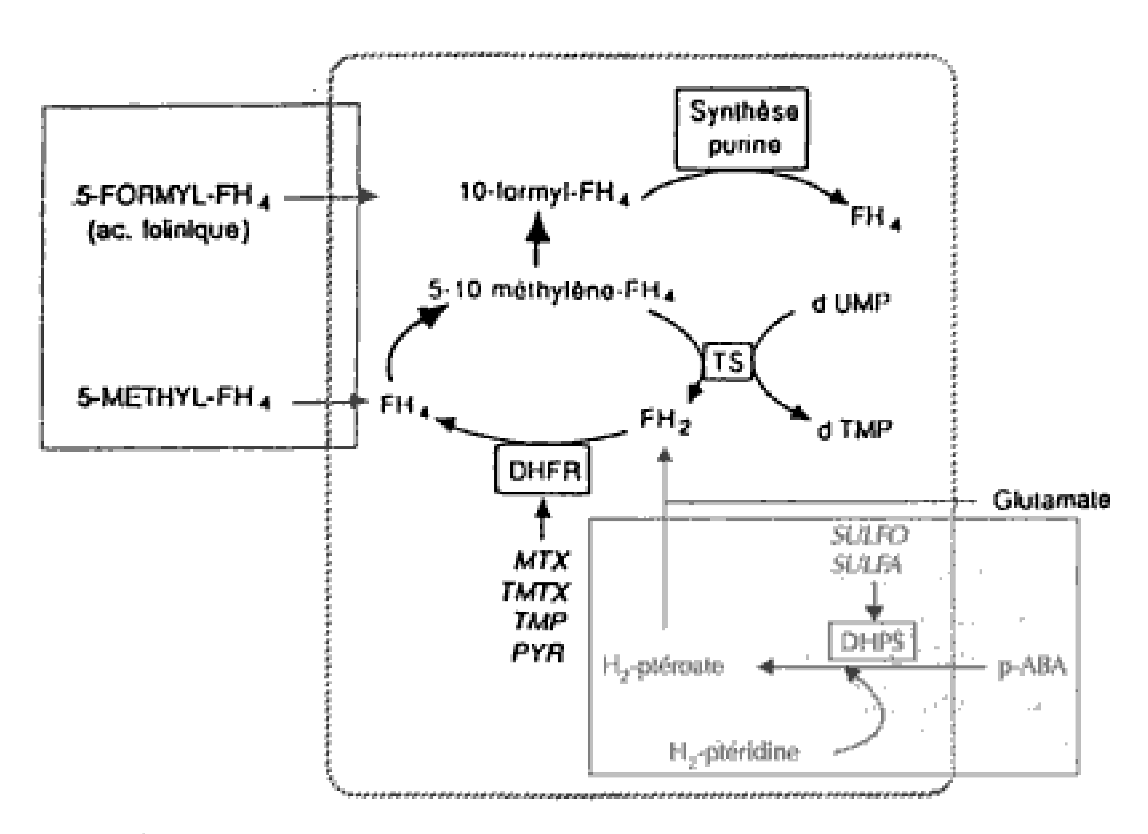
■ *Spiramycine*

Ce macrolide réalise le traitement de choix de la femme enceinte. Toutefois, son action sur le toxoplasme, dont le mécanisme demeure inconnu, ne se manifeste pleinement que pour des posologies élevées. Elle reste parasitostatique.
La spiramycine (Rovamycine®) est administrée lorsque le risque de contamination d'une femme enceinte séronégative est jugé important ou en cas de séroconversion pendant la grossesse.
On administre alors 3 g/j pendant toute la grossesse.
L'administration de spiramycine ne protège pas le fœtus en cas de passage transplacentaire du parasite. De même, l'antibiotique ne franchit pas la barrière hématoméningée et ne peut être utilisé dans les atteintes cérébrales.
En cas d'intolérance, il est possible d'administrer de la roxithromycine (Rulid®, hors AMM).

■ *Sulfamides*

Les sulfamides, comme les diaminopyrimidines, interfèrent dans la biosynthèse de l'acide folinique des bactéries et des parasites sensibles. Son précurseur est l'acide folique, synthétisé *in vivo* chez la bactérie à partir d'acide p-aminobenzoïque, de ptéridines et d'acide glutamique (il est apporté par l'alimentation chez les organismes supérieurs). La *figure 1* (*cf. infra*) montre comment les sulfamides agissent en synergie avec la triméthoprime. Toutefois, la demi-vie prolongée de certains sulfamides (sulfadoxine par exemple) expose à une majoration des risques d'effets indésirables. On administre parfois, hors AMM, l'association fixe sulfadoxine + pyriméthamine (Fansidar®, un antipaludéen existant sous forme injectable), et souvent l'association sulfaméthoxazole + triméthoprime (= cotrimoxazole, Bactrim®) (*cf. « Sulfamides antibactériens et diaminopyrimidines »*).
En cas d'allergie aux sulfamides, les alternatives peuvent être la clindamycine (Dalacine®), la clarithromycine (Zéclar®, Naxy®), l'atovaquone (Wellvone®) ou l'azithromycine (Zithromax®), dans tous les cas hors AMM.

En cas d'atteinte clinique, on associera pendant au moins 6 semaines pyriméthamine, sulfadiazine, spiramycine et éventuellement corticothérapie. Les atteintes déjà réalisées sont globalement irréversibles.



FH2 : Dihydrofolate FH4 : Tétrahydrofolate
p-ABA : Acide para-aminobenzoïque
DHPS : Dihydroptéroate synthétase
DHFR : Dihydrofolate réductase
MTX : Méthotrexate (anticancéreux = Ledertrexate®, etc.)
TMTX : Trimétrexate (non commercialisé en France)
TMP : Triméthoprime (Wellcoprime®, Bactrim®, etc.)
PYR : Pyriméthamine (Malocide®, Fansidar®)
En grisé : voie métabolique exclusivement présente dans le parasite (il n'y a pas de DHPS dans la cellule animale).
En blanc : voie métabolique exclusivement présente dans la cellule animale (les parois du parasite sont imperméables à ces composés).
Le mode d'action principal de l'association sulfadiazine-pyriméthamine ou de la dapsone est l'inhibition de la dihydrofolate réductase et de la déhydroptéroate synthétase, qui interviennent dans l'anabolisme de l'acide folique. Il y a synergie entre les sulfamides et la pyriméthamine car les deux produits agissent sur une séquence enzymatique essentielle au métabolisme des folates dans le parasite.
Les sulfamides ont une structure de base qui rappelle celle du p-ABA et constituent donc un faux substrat qui entre en compétition avec celui-ci, lequel est indispensable à la survie des parasites. Ceux-ci doivent ainsi obligatoirement synthétiser leur acide folique, contrairement à l'homme qui le puise dans son alimentation.
L'acide folique (FH2) est ensuite réduit en acide tétrahydrofolique ou acide folinique qui est un cofacteur de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. On conçoit ainsi qu'une carence en p-ABA permette à la souris d'éliminer des parasites sans que son métabolisme soit touché ; en revanche, l'action de la pyriméthamine peut induire, même chez l'homme, un déficit en acide folinique qu'il convient de suppléer en administrant ce produit sous forme de médicament.

Figure 1. Métabolisme des folates et site d'action des antiparasitaires antifoliques dans le parasite et la cellule animale

Ses effets indésirables sont mineurs. Nous relèverons :

- des troubles digestifs bénins ;
- une saveur métallique dans la bouche ;
- des céphalées et vertiges ;
- de rarissimes convulsions ;
- des troubles cutanés avec sécheresse des muqueuses ;
- une leucopénie modérée, spontanément réversible ;
- un effet Antabuse lors de l'absorption d'alcool.

De ce fait, le métronidazole n'est contre-indiqué qu'en cas de troubles neurologiques préexistants, de dyscrasies sanguines ou de sensibilité particulière aux imidazoles. Il n'est pas conseillé lors des trois premiers mois de la grossesse, mais aucun effet tératogène chez l'homme n'a jamais été rapporté. De même, on évite de l'administrer chez la femme allaitante.

Des molécules apparentées tels l'ornidazole (Tibéral®), le tinidazole (Fasigyne®) ou le secnidazole (Secnol®) ont une activité analogue sur les amibes. Ces produits de seconde génération ont une cinétique optimisée, limitant la fréquence de leur administration mais ils demeurent tous, compte tenu de leur excellente diffusion dans le sang, de médiocres amœbicides de contact.

Les *hydroxy-8-quinoléines* développent une activité antiamibienne de contact intéressante.

Tiliquinol + tilbroquinol (Intétrix®) sont indiqués en complément d'un amœbicide tissulaire dans les formes dysentériques ou isolément dans les formes asymptomatiques. Des effets latéraux neurologiques (neuropathies périphériques et atteintes du nerf optique) ont diminué l'intérêt attaché à ce groupe de médicaments, même si ces effets n'ont pas été décrits avec cette spécialité. De toute façon, on évite de l'administrer sur des périodes supérieures à 10 jours sans examen médical.

B. Traitement de la giardiose (lambliose)

Giardia intestinalis, présent chez 10 % de la population mondiale, ne donne généralement lieu à aucune plainte clinique, se contentant d'induire des diarrhées récidivantes et irrégulières, susceptibles d'entraîner une malabsorption chez le jeune enfant.

Ici encore, les 5-nitro-imidazoles et notamment le métronidazole ou le secmidazole représentent un traitement de choix, en procédant par cures d'une semaine renouvelées 2 à 3 fois à 5 jours d'intervalle pour prévenir toute réinfestation par les kystes nouvellement éclos.

Les formes résistantes sont traitées par l'albendazole (*cf. infra*) (Zentel®) à la posologie de 400 mg/j de 3 jours à 5 jours.

Une alternative à ce traitement pourra être réalisée par la mépacrine (quinacrine) mais cette substance, proche de la chloroquine utilisée dans le traitement du paludisme, est moins bien tolérée (troubles digestifs graves et psychoses toxiques). La posologie est alors de 300 mg/j pendant 7 jours. Ce produit n'est pas commercialisé en France mais est préconisé par les auteurs anglo-saxons.

C. Autres protozoonoses intestinales

Les infections à *Trichomonas intestinalis* sont traitées par les 5-nitro-imidazoles.
Les balantidioses, infections à *Balantidium coli*, donnent des manifestations coliques ou dysentériques exceptionnelles, qui sont traitées par des tétracyclines, des nitro-imidazoles et des amœbicides de contact.
Les coccidioses donnent lieu à des symptômes graves chez les sujets immunodéprimés et sont traitées par les sulfamides (cotrimoxazole), la spiramycine ou les nitro-imidazoles.

III. Anthelminthiques dérivés du benzimidazole

Les helminthes sont des vers parasites de l'homme (entre autres) responsables d'une importante morbidité au plan mondial, notamment dans les zones économiquement défavorisées. Leur transmission requiert un vecteur spécifique (insecte, mollusque, mammifère domestique) et la contamination suit un cycle fécal-oral.
On distingue trois groupes d'helminthes :

- les nématodes ou vers ronds ;
- les trématodes ou vers plats non segmentés ;
- les cestodes ou vers plats segmentés.

Cette distinction essentiellement zoologique (relire à ce propos l'article de parasitologie sur ces vers et leur cycle) concerne incidemment le pharmacologue : les vers sont, selon leur groupe, plus ou moins sensibles à tel ou tel médicament.
Il y a maintenant une quarantaine d'années que Brown a montré l'intérêt de l'activité du thiabendazole dans le traitement des helminthiases. Cette découverte fut à l'origine du développement dans diverses indications parasitologiques du groupe chimique des benzimidazoles, associant un cycle benzénique à un cycle imidazole (les nitro-imidazoles ne sont pas utilisables pour traiter les helminthiases). Nous n'envisageons ici que les dérivés principaux de ce groupe, mais il en existe de nombreux commercialisés dans la plupart des pays.
La substitution du noyau benzimidazole, tout particulièrement sur les positions 2 et 5, a permis d'obtenir des molécules extrêmement puissantes. Les molécules 2-carbamate benzimidazole se sont révélées intéressantes et, dans ce groupe, nous retrouvons le mébendazole, le flubendazole, le ciclobendazole, etc. Ces substances sont faiblement résorbées au niveau intestinal et, pour améliorer cela, des prodrogues ont été synthétisées et sont à l'étude.
Les benzimidazoles sont métabolisés de façon variable par les systèmes du cytochrome P450 et de la flavine-monooxygénase. Ils sont généralement transformés sur la substitution en 5, par hydroxylation, S-oxydation ou réduction. La fonction 2-carbamate pourra être décarboxylée en amine et le noyau benzimidazole hydroxylé directement.
Les benzimidazoles sont les seuls anthelminthiques ayant un spectre large. Ils agissent par interaction avec les microtubules cytoplasmiques en inhibant la polymérisation de la tubuline, induisant une dégénérescence des téguments et en bloquant l'absorption du glucose par le ver. L'animal est alors digéré ou expulsé par

Ses effets indésirables sont ceux classiquement décrits pour le groupe mais souvent aggravés, avec des troubles digestifs, neurologiques (céphalées et somnolence, vertiges, altération de la vision des couleurs) et psychiques (administrer alors du diazépam), des risques d'hypoglycémie. Des réactions d'hypersensibilité ont été décrites, ainsi que des troubles cardio-vasculaires (bradycardie ou hypotension).
Le tiabendazole est indiqué dans les anguilluloses et, hors AMM, les *Larva migrans* cutanées, la trichinose et les trichostrongyloses à raison de 50 mg/kg/j pendant 3 jours (sans dépasser 3 g/j), dans les capillarioses éventuellement à raison de 50 mg/kg/j pendant un mois.
Le tiabendazole (Mintezol® en comprimés à 500 mg et en suspension orale) n'est plus commercialisé en France et est remplacé par l'ivermectine.

E. Triclabendazole

Parasite actif sur les formes immatures et adultes des parasites et indiqué dans le traitement de la fasciolase due à *Fasciola hepatica* ou à *Fasciola gigantica*, le triclabendazole (Egaten®, cp. 250 mg) se distingue des autres dérivés de cette classe par des caractéristiques structurales (notamment la présence d'atomes de chlore). Il est administré à la dose de 10 mg/kg en une prise ; toutefois, une seconde dose peut être administrée dans les 12 à 24 heures en cas d'infestation sévère.
Ce traitement est souvent associé à un antispasmodique, de 5 à 7 jours, pour réduire la douleur et l'ictère provoqués par l'élimination massive par les voies biliaires des parasites morts.
Sa prescription doit rester prudente chez les patients présentant un allongement QTc ou des antécédents de symptômes évocateurs de QT, ainsi qu'en cas d'association à des médicaments pouvant agir sur le QT.

IV. Avermectines

L'ivermectine est la première avermectine commercialisée en vue d'une utilisation en médecine humaine. Isolée d'une culture de streptomycines, cette molécule présente une affinité importante pour les canaux chlorures glutamate-dépendants des cellules nerveuses et musculaires des invertébrés (les mammifères sont dépourvus de ces canaux). En favorisant l'entrée des chlorures dans la cellule, elle induit une hyperpolarisation avec paralysie neuromusculaire pouvant entraîner la mort de certains parasites.
L'ivermectine (Stromectol®, cp. 3 mg, Mectizan®, cp. 3 mg) est indiquée dans le traitement de la strongyloïdose (anguillulose) gastro-intestinale, dans le traitement de la microfilarémie chez les sujets atteints de filariose lymphatique à *Wuchereria bancrofti*, dans le traitement de la gale sarcoptique humaine et dans celui de l'onchocercose.
La posologie moyenne est de 200 µg/kg en une prise orale unique (anguillulose gastro-intestinale). Les effets indésirables sont liés avant tout à la densité parasitaire : fièvre, céphalées, asthénie, douleurs diverses, réactions d'hypersensibilité, réactions ophtalmologiques.

Le traitement n'est pas prophylactique et il n'y a pas d'études adaptées au traitement de l'anguillulose chez le sujet immunodéficient.

L'essentiel de la question

Si les sulfamides ont perdu de leur intérêt comme antibiotiques, ils demeurent toujours partie intégrante de la stratégie thérapeutique de la toxoplasmose en association à la pyriméthamine, avec complémentation en acide folinique dès que la spiramycine isolée ne peut suffire.
Dans la pratique, le traitement de la toxoplasmose ne s'impose que chez la femme enceinte, chez le nouveau-né ou chez le sujet immunodéprimé, notamment en cas de séropositivité VIH.
Le traitement des amibiases intestinales repose sur l'administration de 5-nitro imidazoles, une famille de produits homogènes bien connue comme agents antifongiques. Ces mêmes médicaments permettent de traiter les giardioses.
Les anthelminthiques dérivés du benzimidazole sont nombreux. L'albendazole est fréquemment prescrit en France, à la faveur notamment d'une indication spécifique, celle du traitement des échinococcoses (kystes hydatiques).
Le développement d'une nouvelle famille, celle des avermectines, représentée par l'ivermectine, a renouvelé, dans certaines indications (anguilluloses), les stratégies de traitement des parasitoses.

Pour en savoir plus

- *Adresse Internet : http://arachosia.univ-lille2.fr/labos/parasito/Internat/courspar/toxopl.html.*
- Banque de données automatisée sur les médicaments (BIAM).
- J.-G. Hardman et L.-E. Limbird. *Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments.* Goodman & Gilman, McGraw-Hill ; 9e éd., 1998.

Immunomodulateurs (médicaments immunosuppresseurs, médicaments immunostimulants) et facteurs de croissance hématopoïétiques

D. RICHARD, Pharmacien, pharmacie centrale, centre hospitalier Henri Laborit, Poitiers,
C. CHARPENTIER, Étudiante, AHU, CHHL, Poitiers.

B. Effets indésirables communs

- Risque infectieux

  Les agents immunosuppresseurs induisent un risque d'infection car leur administration est à l'origine d'une neutropénie, d'une lymphopénie et d'une diminution de la synthèse des immunoglobulines. Ils favorisent le développement des infections bactériennes à germes saprophytes comme celui des mycoses, des infections virales, des infections à mycobactéries, des pneumocystoses, des aspergilloses, des cryptococcoses, des nocardioses.
  Pour cette raison, les protocoles d'immunosuppression comportent souvent une prophylaxie primaire anti-infectieuse : administration d'aciclovir pour prévenir les infections herpétiques, administration de triméthoprime ou de pentamidine pour prévenir les infections à *Pneumocystis*, etc.
  Cela explique que l'on ne puisse effectuer de vaccination par un vaccin à germes vivants (rubéole, oreillons, rougeole, varicelle, poliomyélite orale, fièvre jaune, BCG) pendant que le patient suit un traitement immunosuppresseur ;

- Risque hématologique

  Tous les immunosuppresseurs majeurs sont hématotoxiques, exception faite des glucocorticoïdes, de la ciclosporine, du tacrolimus, du léflunomide. Leur prescription impose la réalisation hebdomadaire puis mensuelle d'une numération-formule sanguine. La cytopénie induite par le méthotrexate peut être prévenue par l'adjonction d'acide folinique (Lederfolate®, Osfolate®) (le méthotrexate inhibe en effet la tétrahydrofolate-réductase catalysant la transformation de l'acide folique en acide folinique, qui en est le métabolite actif) ;

- Risque carcinogène

  Certains médicaments immunosuppresseurs, par leur action propre, peuvent inhiber les mécanismes physiologiques contrôlant le développement des cellules tumorales, avec un risque carcinogène d'autant plus important que le traitement est plus long, que les posologies sont fortes et que plusieurs molécules immunosuppressives sont associées.
  Le cyclophosphamide est connu pour favoriser le développement de tumeurs épithéliales de la vessie et pour induire des leucémies myéloïdes, le méthotrexate et la ciclosporine peuvent induire des lymphomes non-hodgkiniens B. Les associations immunosuppressives utilisées dans les protocoles de contrôle des rejets de greffe peuvent induire des épithéliomas cutanés ou des sarcomes de Kaposi ;

- Risque tératogène

  La tératogénicité reconnue de certaines molécules (cyclophosphamide, méthotrexate, léflunomide, etc.) fait imposer lors de leur prescription une contraception chez toute femme en âge de procréer. L'absence de données justifie une contraception lors de l'utilisation de tacrolimus, de mycophénolate ou des inhibiteurs du signal de transduction. La grossesse ne représente pas, en revanche, une contre-indication à un traitement par azathioprine ou ciclosporine.

- Léflunomide

  Le léflunomide (Arava®) est une prodrogue dérivée de l'isoxazole dont le métabolite actif inhibe la production des pyrimidines par action sur la dihydrofolate déhydrogénase (DHODH). La réduction de la concentration des pyrimidines induit un blocage préférentiel du cycle des cellules sensibles et particulièrement des lymphocytes T activés, des cellules impliquées dans la pathogénie de la polyarthrite. Une voie de « récupération » des pyrimidines, décrite dans les autres types cellulaires, explique que l'action du léflunomide reste ciblée.

  Le métabolite actif du léflunomide a une demi-vie d'élimination de 10 à 15 jours, ce qui explique qu'il faille administrer initialement une dose de charge. Il n'y a pas d'interactions significatives, ni avec l'alimentation, ni avec d'autres médicaments. Dans un domaine où les traitements sont grevés d'effets indésirables d'autant plus péjoratifs que l'état général du patient est altéré, le profil de tolérance du léflunomide est favorable à l'observance de la prescription : la survenue d'événements indésirables graves est comparable à celle du groupe placebo. Diarrhées transitoires ou élévation modérée des transaminases n'obèrent pas la poursuite du traitement et il n'y a pas d'effets indésirables, hématologique, pulmonaire ou rénal.

- Mycophénolate mofétil

  Il y a longtemps déjà que l'on avait pu observer une immunosuppression chez des patients atteints d'un déficit congénital du métabolisme des purines. Partant de cette observation, une recherche fut entreprise, il y a maintenant plus de 15 ans, pour comprendre les interactions entre la voie de synthèse dite « de novo » des purines, l'activité inosine monophosphate déshydrogénase (IMDPH) et l'immunité. Le mycophénolate mofétil (MMF) est une prodrogue issue de ce travail. Il s'agit du morpholinoéthylester de l'acide mycophénolique (MPA), forme chimique améliorant sa biodisponibilité. Il est obtenu par fermentation de plusieurs espèces de Penicillium.

  Mode d'action. Le mycophénolate exerce simultanément plusieurs activités complémentaires liées à son action sur la voie de synthèse « de novo » des purines.

  - Action antiproliférative

    L'acide mycophénolique inhibe de façon puissante, réversible et non compétitive, une enzyme clé de la voie de synthèse de novo des bases puriques, l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH). Les lymphocytes B comme les lymphocytes T utilisent préférentiellement cette voie de synthèse, contrairement aux autres types cellulaires. Le mycophénolate va donc induire une inhibition très sélective de la prolifération des cellules immunocompétentes, propriété bien mise en évidence par les tests de stimulation par la phytohémagglutinine ou la protéine A du staphylocoque. On sait de plus que la molécule agira même sur les étapes tardives (> 72 heures) de la réaction ;
  - Inhibition de la formation d'anticorps

    L'administration d'acide mycophénolique induit une réduction de l'immunisation des patients secondaires à un traitement par sérum antilymphocytaire ;
  - Inhibition de l'adhésion des lymphocytes et des monocytes sur les cellules endothéliales

    Elle résulte de l'inhibition GTP-dépendante de la glycosylation des molécules d'adhésion par inhibition du transfert du mannose et du fucose ;
  - Inhibition de la prolifération des cellules de la paroi vasculaire.

du cycle cellulaire, d'une façon spécifique et réversible. Son effet immunosuppresseur découle de sa fixation sur un récepteur cytoplasmique du groupe des immunophilines, la ciclophiline. Le complexe ciclosporine/ciclophiline se lie à la calcineurine, ce qui entraîne l'inhibition d'une activité enzymatique indispensable à la transcription, surtout des nombreux gènes des lymphocytes T codant pour des cytokines spécifiques et notamment pour l'interleukine-2 (IL-2).
Contrairement aux médicaments cytostatiques, la ciclosporine ne déprime pas l'hématopoïèse et ne perturbe pas les fonctions phagocytaires.
Cinétique. La ciclosporine est une molécule lipophile, dont la biodisponibilité après administration orale varie entre 20 à 50 % pour la forme anciennement commercialisée (Sandimmun®). La commercialisation d'une formulation sous forme d'une micro-émulsion résorbable au niveau de l'intestin, présentée sous forme de capsules (Néoral®), a optimisé l'ancienne formulation par une augmentation moyenne de 30 % de l'aire sous la courbe, à posologie égale, peu dépendante des sécrétions biliaires comme pancréatiques, par une relative indépendance vis-à-vis de la réplétion gastrique, facilitant l'observance du traitement par un gain dans la reproductibilité interindividuelle et intra-individuelle de l'exposition au médicament, et par une corrélation plus étroite entre l'exposition au médicament et la ciclosporinémie. La distribution de la ciclosporine est importante dans le compartiment extravasculaire (foie, rein, glandes endocrines, tissu adipeux). La liaison plasmatique est voisine de 90 %. La ciclosporine subit un important métabolisme, avec hydroxylation et déméthylation. L'élimination est essentiellement biliaire avec une demi-vie terminale de 9 heures environ.
Indications. La ciclosporine constitue un traitement de référence lors des transplantations d'organe (prévention du rejet de greffon, traitement du rejet) ou de moelle osseuse. Elle est aussi indiquée dans diverses pathologies auto-immunes : syndrome néphrotique (en deuxième intention), psoriasis sévère et étendu, dermatite atopique sévère de l'adulte, forme sévère de polyarthrite rhumatoïde, uvéite.
Effets indésirables. Les effets indésirables du traitement par ciclosporine sont pour l'essentiel dose-dépendants : effets extrarénaux (notamment hypertension artérielle, élévation de la bilirubinémie, des phosphatases alcalines et des γGT, uricémie avec crises de goutte, rétention hydrosodée, troubles gastro-intestinaux, hypertrichose, hypertrophie gingivale, paresthésies et tremblements) ainsi qu'effets indésirables rénaux aigus ou chroniques susceptibles d'induire à terme une insuffisance rénale. L'administration de ciclosporine n'influence pas en elle-même la dégradation de la fonction rénale lorsqu'un rejet chronique survient.
Le traitement impose une surveillance de la ciclosporinémie tous les 2 à 3 jours pendant 1 mois puis toutes les 2 à 4 semaines. Elle est comprise entre 150 et 250 ng/mL dans la phase initiale d'un traitement post-transplantation, puis comprise entre 100 et 150 ng/mL en traitement d'entretien. Ce traitement impose également un contrôle régulier de la fonction rénale (dosage de la créatinine plasmatique toutes les 2 semaines pendant les 3 premiers mois du traitement, puis toutes les 4 semaines) et une surveillance de la tension artérielle.
Interactions médicamenteuses. Elles sont nombreuses et ont une incidence clinique éventuelle lorsqu'elles affectent le métabolisme. Nombre d'anti-infectieux augmentent les taux sériques de l'immunosuppresseur (macrolides, imidazoles), tout comme les antagonistes calciques, les anti-H2, les contraceptifs oraux, les

corticostéroïdes. Les inducteurs enzymatiques, en revanche, diminuent la ciclosporinémie (antituberculeux, antiépileptiques inducteurs, sulfamides, etc.). En cas d'association méthotrexate + ciclosporine, les 2 médicaments diminuent respectivement leur clairance, d'où l'augmentation réciproque de leur toxicité et la nécessaire adaptation posologique. Enfin, les médicaments néphrotoxiques associés à la ciclosporine (aminosides, amphotéricine, sulfamides, agents alkylants, sérum antilymphocytaire, etc.) augmentent le risque d'accident rénal.

- Tacrolimus (Prograf®)

  Le tacrolimus est un macrolide que son mécanisme d'action apparente à celui de la ciclosporine. Il s'agit d'un produit d'extraction, obtenu à partir d'une souche de *Streptomyces tsukubaensis* en 1984.

  Comme la ciclosporine, le tacrolimus inhibe la voie de la calcineurine. Il se fixe sur une immunophiline, la *FK Binding Protein* (FKBP). Cette fixation modifie des signaux intracellulaires calcium-dépendants connus pour réguler l'expression des gènes codant diverses cytokines (interleukine -2 et interleukine-3, interféron γ). Le tacrolimus inhibe aussi l'expression du récepteur à l'interleukine-2, ce qui supprime l'activation et la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques, responsables du rejet du greffon.

  Les propriétés cinétiques du tacrolimus sont proches de celles de la ciclosporine : il s'agit d'une molécule lipophile dont la biodisponibilité est réduite (environ 20 %, variable selon la réplétion gastrique, mais non influencée par la bile, contrairement à la ciclosporine), métabolisée au niveau hépatique par le cytochrome P-450 3A (le 13-déméthyl-tacrolimus domine, son activité *in* vivo est inconnue) avant d'être éliminée essentiellement par voie biliaire. Elle donne lieu à une importante variation inter comme intra-individuelle.

  Les effets indésirables et les interactions médicamenteuses du tacrolimus sont comparables à ceux de la ciclosporine. Toutefois, les effets rénaux sévères sont moins fréquents avec cette molécule : diminution du flux sanguin rénal cortical, élévation des résistances rénales vasculaires. On a également rapporté des infections, des troubles neurologiques (tremblements, paresthésies), un syndrome lymphoprolifératif et une hyperglycémie susceptible d'évoluer en diabète. La posologie initiale est, dans le cas d'une greffe rénale, comprise entre 0,01 et 0,05 mg/kg/j dès la fin de l'intervention en perfusion continue sur 24 heures ; avec relais oral à raison de 0,1 à 0,3 mg/kg/j. Ce schéma est ajusté en fonction des taux sériques. Le tacrolimus (Prograf®) est une molécule à index thérapeutique étroit, imposant un suivi des concentrations sanguines : les concentrations résiduelles sanguines doivent être comprises entre 5 et 15 ng/mL.

5. Inhibiteurs du signal de prolifération : sirolimus et évérolimus

Sirolimus (Rapamune®) et évérolimus (Certican®) se fixent sur une immunophiline intracellulaire, la *FK-binding protein 12* (FKBP 12) : le complexe ainsi formé inhibe l'activité de la FRAP (*FKBP Rapamycin Associated Protein*) ou mTOR (« mammalian *Target Of Rapamycin* »), une kinase impliquée dans l'activation des cyclines dont dépend le passage de la cellule de la phase G1 à la phase S. En inhibant l'activité de la FRAP, ces immunosuppresseurs bloquent *in vitro* l'activité

d'une autre kinase (p70 S6), ce qui entraîne une inhibition sélective de la transcription d'ARNm et de la traduction de nouvelles particules ribosomales.
Ce sont donc des inhibiteurs de la transduction du signal de prolifération cellulaire et d'expansion clonale des cellules T activées, initié par l'IL-2.
Leur mode d'action diffère :

- de celui des inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine = Néoral® ou Sandimmun®, tacrolimus = Prograf®) qui bloquent la synthèse et la sécrétion de l'interleukine-2 (IL-2) par les lymphocytes T auxiliaires ;
- de celui du mycophénolate (Cellcept®, Myfortic®), un inhibiteur non compétitif et réversible de l'inosine monophosphate déshydrogénase bloquant la synthèse de novo des nucléotides à base de guanine et donc la prolifération des lymphocytes B et T.

Comme les inhibiteurs de la calcineurine et les inhibiteurs du signal de prolifération agissent par l'inhibition d'étapes successives dans la réponse immune à médiation cellulaire, leur association est synergique dans la prévention des rejets de greffe. Elle permet notamment de réduire l'exposition à la ciclosporine, d'où un meilleur respect de la fonction rénale chez les transplantés rénaux et cardiaques.

- Sirolimus (Rapamune®)

  Le sirolimus (Rapamune®) est un immunosuppresseur, dérivé actif par voie orale de la rapamycine, un macrolide produit par *Streptomyces hygroscopicus* (un actinomycète isolé en 1975). La posologie est adaptée en fonction des dosages sanguins.
  Le sirolimus est métabolisé par l'isoforme CYP3A4 du cytochrome P450. Il induit une élévation parfois importante du cholestérol et des triglycérides, ainsi que d'autres effets indésirables moins spécifiques : œdème, lésions dermatologiques à type d'acné, troubles digestifs, infection, leucopénie.
  La néphrotoxicité du sirolimus impose de l'associer à la ciclosporine en réduisant la posologie de cette dernière.

- Évérolimus (Certican®)

  L'évérolimus (Certican®) diffère du sirolimus par la présence d'un radical 2-hydroxyéthyl en position 40 qui augmente sa polarité, améliorant donc sa solubilité comme sa stabilité. Analogue au précédent par ses propriétés, il constitue une alternative au mycophénolate ou au sirolimus en association à d'autres immunosuppresseurs dans l'allogreffe rénale, et à l'azathioprine, voire au mycophénolate, dans l'allogreffe cardiaque.
  La néphrotoxicité de l'évérolimus impose de l'associer à la ciclosporine en réduisant la posologie de cette dernière.

6. Anticorps polyclonaux

Les anticorps polyclonaux antilymphocytaires (SAL, sérum antilymphocytaire) agissent par fixation puis opsonisation des lymphocytes T qui sont ensuite phagocytés par le système réticulo-endothélial. Chez l'homme, le sérum antilymphocytaire supprime les réactions cutanées d'hypersensibilité retardée, retarde les crises de rejet d'organe au cours des transplantations, diminue leur nombre et leur intensité et permet de traiter des crises tardives irréversibles sous corticoïdes.

- Sérum antilymphocytaire d'origine équine

  L'immunisation du cheval est obtenue par injection de lymphocytes humains extraits du thymus ou par drainage du canal thoracique. Le plasma du cheval est purifié selon la technique de Cohn et les anticorps indésirables sont éliminés avant purification sur résine. La Lymphoglobuline® (flacon 100 mg) est indiquée – en association à d'autres immunosuppresseurs – dans les transplantations d'organes (rein) ou de tissu (moelle osseuse) et est proposée dans le traitement des aplasies médullaires graves résistantes aux traitements conventionnels. Elle s'administre en perfusion intraveineuse lente, sous couvert d'une administration préalable d'antihistaminique. Il est conseillé de rechercher dans le sérum du patient, avant usage du sérum, des Ac anti-immunoglobuline de cheval. Les réactions d'intolérance sont fréquentes et une maladie sérique (fièvre, urticaire, arthrite) peut apparaître au terme d'une semaine de traitement. Une surveillance hématologique impose une numération quotidienne des hématies jusqu'à 2 semaines après l'arrêt du traitement. Une surveillance rénale est également nécessaire.

- Sérum antilymphocytaire produit par le lapin

  Ici, les immunoglobulines sont obtenues à partir de lapins hyperimmunisés par des suspensions de thymocytes humains. Les indications (Thymoglobuline®, flacon de 25 mg) sont identiques à celles du médicament précédent et le produit est utilisé notamment en cas d'intolérance ou d'immunisation à l'égard du sérum d'origine équine (thrombopénie, maladie sérique).

7. Anticorps monoclonaux

L'administration d'anticorps monoclonaux capables de détruire les lymphocytes T ou de les inactiver participe désormais au quotidien de la stratégie immunosuppressive, en association avec des substances qui inhibent la synthèse de l'interleukine-2 (ciclosporine, tacrolimus). Les anticorps bloquant le CD25 inhibent quant à eux la fixation de la cytokine sur ses récepteurs. Ces deux modes d'action, complémentaires, agissent en synergie pour bloquer la réaction immunitaire cellulaire intervenant dans le mécanisme du rejet.

- Muromonab.

  Le muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®), une immunoglobuline d'origine murine, fut le premier anticorps monoclonal commercialisé dans un but thérapeutique (1985 aux États-Unis). Dirigé contre les récepteurs CD3 des lymphocytes humains, il exerce une activité immunosuppressive puissante. Son action explique qu'il inhibe toutes les fonctions des cellules T inductrices (CD3+, CD4+) comme celles des cellules T cytotoxiques (CD3+, CD8+), en prenant une cible différente de celle des autres agents immunosuppresseurs. Par rapport aux sérums antilymphocytaires, constitués d'immunoglobulines en mélange et incluant donc des anticorps « contaminants » puisque dépourvus de spécificité antilymphocyte T, l'Orthoclone® constitue un médicament homogène dans son action, chaque lot de fabrication étant comparable aux autres.

  Le muromonab est intégré dans les protocoles immunosuppresseurs de *traitement* du rejet d'allogreffe. Prescrit initialement dans le domaine de la transplantation

rénale, il l'est devenu dans le domaine de la greffe cardiaque et hépatique, en curatif du rejet aigu.

L'administration du muromonab s'accompagne d'*effets indésirables* variés. Certains sont fréquents mais bénins : fièvre, céphalées, syndrome pseudo-grippal, nausées et douleurs abdominales. D'autres sont plus rares mais plus graves : hypotension artérielle, œdème pulmonaire, manifestations d'hypoxie cellulaire. Ces manifestations péjoratives surviennent essentiellement lors de la première ou de la deuxième injection du produit.

- Daclizumab

L'interleukine-2 (IL-2), une cytokine produite par les lymphocytes T auxiliaires, est impliquée dans l'expression des réponses immunitaires à médiation cellulaire et dans la synthèse des anticorps. Les lymphocytes activés expriment sur leur membrane un récepteur de haute affinité pour l'IL-2. Ce récepteur est formé par trois sous-unités protéiques : une chaîne peptidique dite CD25 ou antigène des cellules T activées (antigène Tac), spécifique du récepteur, et deux chaînes peptidiques, β et γ, qui ne sont pas spécifiques de ce récepteur. Le CD25 n'apparaît pas chez les cellules non activées : il est mis en évidence chez les seules cellules activées par l'antigène ou par l'IL-2. L'interaction de l'interleukine-2 avec son récepteur déclenche la prolifération et la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T helper, en lymphocytes tueurs et en lymphocytes cytotoxiques. La fixation de l'IL-2 sur le récepteur déclenche une synthèse d'IL-2, d'où rapide amplification du signal.

Le CD25 est exprimé sur les lymphocytes T activés des patients présentant un rejet d'allogreffe – mais non sur les lymphocytes non activés –, d'où l'intérêt d'une stratégie thérapeutique fondée sur un blocage du CD25 visant à empêcher l'IL-2 d'interagir avec son récepteur.

Anticorps monoclonal humanisé de type IgG1, le daclizumab (Zénapax®) a une action spécifique contre la chaîne α du récepteur à l'interleukine-2. Il concourt donc à protéger le sujet transplanté par une activation des lymphocytes T et par la suppression de la sécrétion des cytokines.

Le daclizumab est indiqué dans la prophylaxie du rejet aigu d'organe chez les patients bénéficiant d'une transplantation rénale allogénique de novo, en association avec des protocoles immunosuppresseurs incluant ciclosporine et corticothérapie, chez les patients non hyperimmunisés. Il est conçu pour couvrir la période critique de 3 mois post-transplantation.

La *posologie* recommandée est de 1 mg/kg, dose administrée par voie veineuse périphérique ou centrale dans du sérum physiologique. La dose initiale, administrée dans les 24 heures qui précèdent la transplantation, est suivie d'une administration tous les 15 jours sans excéder 5 administrations consécutives.

Les *effets indésirables* les plus fréquents sont des nausées, une constipation, des œdèmes périphériques, des troubles du système nerveux central (vertiges, manifestations psychiatriques), des troubles cutanés.

- Basiliximab

Le basiliximab (Simulect®, flacon 20 mg) est un anticorps chimérique murin-humain de la classe des IgG. Il bloque la chaîne α (CD25) du récepteur de l'IL-2 avec une affinité équivalente à celle de l'interleukine. De ce fait, il inhibe l'activation

des lymphocytes par l'IL-2 et préserve l'activité des lymphocytes non porteurs de la chaîne α (comme le daclizumab). Des taux sériques faibles, aisément obtenus en thérapeutique (seuil > 0,2 µg/mL), sont suffisants pour saturer les récepteurs IL-2 des lymphocytes périphériques.
Le basiliximab est indiqué dans la prévention du rejet aigu après transplantation rénale allogénique de novo, en association avec un traitement immunosuppresseur à base de ciclosporine (micro-émulsion) et de corticoïdes, chez les patients ayant moins de 80 % d'alloréactivité vis-à-vis des antigènes HLA du panel. La demi-vie biologique du produit autorise des administrations espacées : une injection intraveineuse de 20 mg à J 0 et de 20 mg à J 4 (greffe de rein) maintient la concentration seuil pendant 4 ou 6 semaines selon les individus.

D. Immunosuppresseurs et greffes d'organes

Le rejet aigu de l'organe greffé survient généralement dans les premiers mois qui suivent l'intervention et expose à un risque ultérieur de dysfonctionnement chronique du greffon, ou de perte de celui-ci. La réduction de l'incidence des rejets aigus reste donc un objectif prioritaire du traitement immunosuppresseur. À titre d'exemple, l'incidence des pertes de greffons rénaux dans la première année suivant la greffe est comprise entre 3 et 5 % mais des signes de rejet chronique vasculaire (RCV) peuvent être observés 5 années encore après la transplantation.

1. Évolution des thérapeutiques

L'origine immunitaire des rejets fut démontrée dans les années 1940 mais, si le rôle de l'immunité cellulaire dans le rejet de greffe s'avéra vite établi, l'importance de l'immunité humorale dans le rejet aigu comme chronique n'est pas, aujourd'hui encore, déterminée avec précision.
Les premiers succès de transplantation rénale sous immunosuppression entre frère et sœur non jumeaux furent publiés en 1960. Le receveur était traité par irradiation avant la greffe et par administration comprise entre 50 et 75 mg de cortisone après l'intervention ; le donneur recevait de la cortisone et de la 6-mercaptopurine pour diminuer l'antigénicité du greffon. On obtint la même année les premiers succès en dehors de toute parenté entre donneurs et receveurs, grâce à un traitement antirejet qui consistait en l'irradiation totale du receveur, celle du greffon, et l'administration de 6-mercaptopurine et de 40 mg de cortisone après la greffe. L'azathioprine (Imurel®) fut associée aux corticoïdes dès 1961. Cette association constitua pendant plus de 20 ans le traitement immunosuppresseur de base qualifié de « conventionnel » en transplantation rénale.
Les progrès de l'hémodialyse, de l'immunologie, de la réanimation et de la pharmacologie ont transformé le pronostic des transplantations dans les années suivantes. Le risque de surimmunodépression ne fut plus accepté. Le sérum antilymphocytaire permit une diminution de la fréquence du rejet, au prix d'une augmentation de la fréquence des infections virales et de l'apparition de lymphomes. La ciclosporine, évaluée dès les années 1970, améliora les résultats de la transplantation rénale. L'association corticoïdes-azathioprine-ciclosporine se

généralisa au début des années 1980, à l'époque où fut également développé l'OKT3. Le traitement azathioprine + corticoïdes fit place aux protocoles comportant la ciclosporine, autorisant une épargne en corticoïdes. Depuis, les immunosuppresseurs récents (tacrolimus, sirolimus, évérolimus) ou le développement de nouvelles molécules bouleversent continuellement les schémas de traitement.

2. Traitement préventif du rejet

a) Traitement d'induction (ou d'attaque)

Le protocole d'induction est associé à un traitement adjuvant anti-infectieux visant à prévenir les infections urinaires et opportunistes (cotrimoxazole, fluoroquinolone), les infections fongiques (amphotéricine) et virales (aciclovir ou ganciclovir).

- Quadrithérapie. Elle associe ciclosporine ou tacrolimus et azathioprine, ou mycophénolate et corticothérapie et Ac antilymphocytaires ;
- Traitement séquentiel. Il existe divers protocoles. À titre d'exemple, l'un des plus communément utilisés associe azathioprine ou mycophénolate, corticothérapie et Ac antilymphocytaires avec administration différée (J 5 à J 21) de la ciclosporine de façon à limiter les effets néphrotoxiques, notamment au décours d'une greffe rénale.
  La place des anticorps monoclonaux (daclizumab, basiliximab) dans la prévention des rejets aigus de greffe ne fait pas encore l'objet d'une codification précise.

b) Traitement d'entretien

La trithérapie introduite entre 4 et 6 semaines après la transplantation associe ciclosporine (ou tacrolimus, ou inhibiteur de la transduction du signal), azathioprine (ou mycophénolate) et corticothérapie. Des switchs entre les diverses alternatives sont possibles selon la tolérance du traitement.

La ciclosporine est souvent arrêtée après 6 mois de traitement pour limiter la toxicité rénale mais au prix d'un nombre accrû d'épisodes de rejet. Il est donc fréquent de pallier son action par une augmentation des doses de corticoïdes.

Parfois, l'arrêt des corticoïdes dans un protocole thérapeutique de triple association peut être réalisé avec succès lorsque la fonction du greffon est stable depuis au moins 6 mois. Un rejet peut être bloqué par la reprise des corticostéroïdes et le risque de perte du greffon est faible.

3. Traitement curatif du rejet

Les corticostéroïdes (prednisolone, méthylprednisolone par voie parentérale) constituent le traitement de première intention du rejet. Si le rejet résiste au traitement (corticorésistance) ou rechute lors de la diminution des doses de corticoïdes (corticodépendance), on administre des anticorps antilymphocytes monoclonaux (Orthoclone OKT3®) ou polyclonaux (Lymphoglobuline®, Thymoglobuline®). La règle est de ne pas traiter le rejet à plus de 3 reprises de façon rapprochée et de se limiter à une cure d'OKT3. Les rejets les plus résistants sont traités par le tacrolimus.

virales ou à une stimulation par divers inducteurs. On distingue des interférons α, β et γ, chaque groupe étant lui-même constitué de molécules différentes.
Les interférons agissent après fixation sur des récepteurs membranaires spécifiques, et déclenchent une cascade de réactions permettant à la cellule de résister aux infections virales, ou encore ayant pour conséquence la suppression de la prolifération cellulaire.
Les interférons exercent de plus une action immunomodulatrice en potentialisant l'activité des macrophages et la cytotoxicité spécifique des lymphocytes pour les cellules cibles. De ce fait, ils sont utilisés dans des domaines thérapeutiques variés, incluant l'infectiologie et la cancérologie mais aussi dans le cadre d'une pathologie neurologique évolutive, la sclérose en plaque.
On utilise en thérapeutique :
- l'interféron α (IntronA®, Pégasys®, Roféron-A®, Viraféron®, ViraféronPeg®) et alfacon (Infergen®) ;
- l'interféron β (Avonex®, Bêtaféron®, Rebif®) ;
- l'interféron γ (Imukin®).

a) Neurologie

L'administration d'interféron β-1a (Rebif®, Avonex®) ou β-1b (Bêtaféron®) chez les patients atteints de sclérose en plaques a un effet clinique prouvé, mais le mécanisme de cette action demeure méconnu, comme reste méconnue la physiopathologie de la maladie. Nous ne détaillons pas dans ce cadre ce traitement spécifique.

b) Infectiologie

L'interféron γ-1b recombinant (Imukin®) est indiqué, en association, pour réduire la fréquence des infections graves chez les patients atteints de granulomatose septique chronique. Son mode d'action sur cette maladie demeure inconnu : on suppose que l'interféron γ augmente la cytotoxicité des macrophages en stimulant la respiration cellulaire par la formation de métabolites toxiques de l'oxygène capables d'intervenir en tant que médiateurs dans la destruction des micro-organismes intracellulaires.

c) Cancérologie

Les interférons α-2a et α-2b sont indiqués dans le traitement de diverses maladies prolifératives malignes (leucémie à tricholeucocytes, leucémie myéloïde chronique, myélome multiple, lymphome folliculaire, tumeur carcinoïde, mélanome malin, sarcome de Kaposi, cancer du rein) selon des modalités précises propres à chaque pathologie.

d) Traitement de l'hépatite B chronique

L'interféron α-2 (IntronA®, Roféron-A®, Viraféron®) est indiqué dans le traitement des patients adultes atteints d'hépatite B chronique, possédant des marqueurs de la réplication virale de l'hépatite B, des ALAT élevées et une inflammation active du foie histologiquement prouvée et/ou une fibrose.

e) Traitement de l'hépatite C chronique

L'interféron alfa en monothérapie a constitué la première étape historique du traitement de l'hépatite C : il bénéficie d'une activité immunomodulatrice et antivirale comparable à celle décrite pour l'interféron physiologique. Depuis 1998, le traitement

de l'hépatite C a été « boosté » par l'association d'interféron alfa (IntronA®, Roféron-A®, Viraféron®) recombinant à de la ribavirine (Copegus®, Rebetol®). La commercialisation d'interférons retards (« pégylés ») (Pégasys®, ViraféronPeg®) a ensuite modifié cette stratégie en faveur de l'association interféron alfa-2 pégylé (IFNα PEG) et ribavirine [2].

En effet, la conjugaison covalente d'interféron et de monométhoxy-polyéthylène-glycol (interféron α dit « pégylé » ou peginterféron) permet de réaliser le traitement par voie sous-cutanée en une injection hebdomadaire unique au lieu de 3, puisque sa demi-vie est 10 fois plus élevée. Le peginterféron se dépégyle progressivement en forme libre d'interféron. Il est ainsi possible de contenir les fluctuations de la virémie.

L'IFN alfacon (α « consensus »), obtenu par génie génétique, est constitué d'un enchaînement de 166 acides aminés dont chacun correspond à celui qui est statistiquement le plus répandu, sur une position donnée, parmi l'ensemble des sous-types d'interférons alfa (cela explique qu'il soit qualifié de « consensus » ou IFN-C ou IFN-alfacon-1) (Infergen®) [3]. Il est indiqué en monothérapie essentiellement en cas d'intolérance ou de contre-indication à la ribavirine.

La ribavirine (Copegus®, Rebetol®), un analogue nucléosidique proche de la guanosine, agit après phosphorylation intracellulaire, essentiellement sous forme d'un dérivé triphosphate. Développant une activité virustatique puissante sur divers virus à ADN ou à ARN, elle inhiberait la synthèse d'acide nucléique par diminution du pool cellulaire de guanosine triphosphate, étant ainsi à l'origine d'anomalies structurelles de l'ARN limitant la transcription virale, et elle pourrait exercer une action suppressive directe sur l'activité polymérase virale.

La ribavirine n'a presque pas d'effet direct antiviral sur le VHC mais elle potentialise l'action de l'interféron. Le mécanisme de cette synergie demeure inconnu : elle augmenterait l'induction par l'interféron d'un médiateur cellulaire antiviral enzymatique, la 2'-5' oligoA synthétase, catalysant la dégradation des ARN monocaténaires.

La bithérapie a des effets indésirables résultant d'une addition des effets induits par l'administration de chacune des deux molécules isolément, mais avec une fréquence analogue à celle rapportée lors de l'administration d'une monothérapie d'interféron :

- l'effet indésirable le plus commun est un syndrome pseudo-grippal (frissons, fièvre, courbatures, maux de tête, fatigabilité accrue) disparaissant généralement en 2 semaines environ : il traduit la réponse immunitaire de l'organisme ;
- l'anémie hémolytique, liée à l'accumulation de la ribavirine dans les hématies, se développe en un mois puis demeure stable pendant la durée du traitement, avec une baisse de l'hémoglobinémie de 2,2 g/dL en moyenne. Elle est réversible en quelques semaines.

  Certains signes cliniques banals, du type nausées, dyspnée, prurit, rashs cutanés, anorexie, insomnie, toux… semblent liés à l'administration de ribavirine mais

---

2. Une contre-indication à l'administration de ribavirine (thalassémie notamment), ou la mise en œuvre d'un traitement d'entretien destiné à réduire la fibrose en cas de non-réponse virologique, constituent les seules circonstances où il soit désormais licite d'administrer de l'IFN PEG en monothérapie ; les indications d'une monothérapie de ribavirine sont discutées : fibrose, contre-indication ou intolérance à l'IFNα.
3. L'IFN-alfacon-1 (Infergen®) s'administre à raison de 3 injections SC/semaine, à la dose de 9 µg, soit une dose moindre que celle requise avec les interférons classiques (cependant, les interférons pégylés s'administrent une seule fois par semaine). Il constitue une alternative pour les patients mauvais répondeurs aux autres IFN.

b) Infectiologie

Des essais visent à stimuler la multiplication des lymphocytes par administration d'interleukine-2 recombinante (aldesleukine), selon des modalités analogues à celles utilisées en cancérologie.

3. Facteurs de croissance hématopoïétiques

Les CSF (*Colony Stimulating Factors*) sont des protéines ayant la propriété d'induire la croissance de colonies de cellules obtenues *in vitro* à partir de suspensions cellulaires de la moelle osseuse.
Désormais obtenues par génie génétique, on distingue :
- le facteur de croissance des granulocytes (G-CSF) ;
- le facteur de croissance des granulocytes et des macrophages (GM-CSF) ;
- le facteur de croissance des macrophages (M-CSF) ;
- l'érythropoïétine (EPO)
- l'interleukine-3 (IL-3 = multi-CSF)

Dans la pratique, les activités de ces facteurs se chevauchent partiellement. Le GM-CSF comme l'IL-3 agissent à une phase précoce du processus hématopoïétique et stimulent donc simultanément plusieurs lignées cellulaires. Dans l'organisme, les CSF exercent une action de type paracrine et l'EPO une action de type hormonal.

a) Époétine (EPO)

L'existence de l'érythropoïétine est établie depuis plus de 40 ans mais le clonage de son gène au début des années 1980 a permis de produire une protéine recombinante (époétine ou EPO). L'érythropoïétine est la plus spécifique des molécules agissant comme facteur de croissance : l'action de cette glycoprotéine porte sur la seule lignée érythrocytaire et elle n'a aucune action sur les hématies parvenues à maturité. Le taux sérique varie selon le degré d'anémie de l'organisme, mais dans certaines situations pathologiques ou thérapeutiques, ce taux reste insuffisant : insuffisance rénale chronique, anémie inflammatoire, Sida, cancers, greffes de moelle allogéniques, administration de dérivés du platine en chimiothérapie, etc.
L'époétine s'administre essentiellement par voie sous-cutanée, la cinétique étant alors plus favorable qu'après administration intraveineuse. La molécule trouve une indication naturelle dans le traitement de l'anémie de l'insuffisant rénal chronique ou dans d'autres types d'anémie (Eprex®, NéoRecormon®).
Les administrations s'effectuent alors 3 fois/semaine, ce qui permet de maintenir un hématocrite supérieur à 30 % sans transfusion.
L'époétine est aussi indiquée chez des patients cancéreux (notamment dans les myélomes, les lymphomes non hodgkiniens, les leucémies lymphoïdes chroniques) anémiés à risque de transfusion. S'agissant de tumeurs solides, l'administration est réalisée à raison de 150 U/kg 3 fois/semaine. On observe une réponse favorable chez 50 à 60 % des patients, que la moelle soit ou non envahie et qu'il y ait eu ou non chimiothérapie préalable, à condition de prolonger suffisamment le traitement.

La darbépoétine alfa (Aranesp®) est indiquée dans l'anémie liée à l'insuffisance rénale ainsi que dans l'anémie du patient cancéreux sous chimiothérapie. Différant par sa structure de l'époétine, mais ayant la même action physiologique, elle bénéficie d'une demi-vie terminale prolongée (21 heures).

b) Facteurs de croissance granulocytaires

Une neutropénie constitue un effet indésirable fréquent de la chimiothérapie anticancéreuse dont elle limite la posologie. Elle entraîne une morbidité et une mortalité importantes : tout patient fébrile sous traitement cytotoxique doit être hospitalisé et placé sous antibiothérapie. Les facteurs de croissance hématopoïétiques sont des cytokines qui limitent la toxicité médullaire des chimiothérapies, en prophylaxie comme en curatif.
Dans la première éventualité, le facteur s'administre en même temps que le premier cycle de la chimiothérapie (prophylaxie primaire) ; dans la seconde, il est administré aux seuls patients ayant déjà présenté une surinfection lors d'un épisode neutropénique (prophylaxie secondaire). Leur prescription (G-CSF = *granulocyte colony-stimulating factor*, ou GM-CSF = *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) réduit la durée et la sévérité des épisodes neutropéniques, ce qui limite le nombre et la durée des hospitalisations et rend possible l'augmentation des doses de médicaments cytotoxiques.
Par ailleurs, ces facteurs s'administrent aux patients en aplasie après greffe de moelle, qu'il s'agisse d'une autogreffe, d'une allogreffe ou d'une non-prise de la greffe – auquel cas, les facteurs de croissance améliorent la survie médiane.
Les facteurs trouvent également leur indication dans les protocoles d'autogreffe de cellules souches du sang, où ils améliorent la mobilisation des cellules souches collectées en association à une chimiothérapie préalable. On administre encore des facteurs de croissance pour stimuler les donneurs sains de cellules souches en cas d'allogreffe de cellules souches, dans les leucémies lymphoblastiques, les syndromes myélodysplasiques, les anémies aplastiques, les neutropénies chroniques sévères et le Sida, où ils permettent d'améliorer la tolérance hématologique de la zidovudine (Rétrovir®) et la toxicité médullaire du ganciclovir (Cymévan®).
En pratique, le G-CSF est prescrit sous la forme de protéines recombinantes, chimiquement fort proches et ayant des propriétés comparables : le filgrastim ou son dérivé pégylé, le pegfilgrastim, et le lénograstim.
Le GM-CSF n'est pas disponible en France : il est commercialisé sous la désignation de molgramostim (Leucomax®).
L'administration de ces facteurs a des effets indésirables réduits : douleurs osseuses et dorsales, céphalées, dysurie, élévation des phosphatases alcalines, élévation de l'activité de la lactate déshydrogénase, hyperleucocytose, thrombopénie, rare détresse respiratoire par infiltration pulmonaire. Cette administration pourrait augmenter le risque de survenue d'une hémopathie maligne, d'où la contre-indication en cas de syndrome myélodysplasique, de leucémie aiguë myéloïde secondaire ou de leucémie myéloïde chronique.

des molécules de synthèse, les progrès concernent avant tout le domaine des cytokines (interférons, interleukines) dont l'usage, très spécifique, se généralise mais implique toujours une surveillance rigoureuse en raison des effets indésirables induits par leur administration.

Pour en savoir plus

- Boulieu R., Bolon M., Mornex J.-F. « Traitement médicamenteux de la greffe » in *Pharmacie clinique et thérapeutique*. Sous la direction de F. Gimenez, M. Brazier, J. Calop, T. Dine, L. Tchiakpé, 2e éd. Masson, Paris, 2002 :1167-86.
- Diasio R.-B., Lo Buglio A.-F. « Immunomodulateurs : médicaments immunosuppresseurs et immunostimulants » in *Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments*. Goodman & Gilman, 9e éd., McGraw Hill, traduction française 1998 : 1281-96.
- Falconi I. *et al. Prévention du rejet aigu de greffes rénales : place des anticorps monoclonaux*. Dossier du CNHIM, XXV (1), 2004 : 1-109.
- Rose H.-S., Armstrong E.-J., Klickstein L.-B., Madsen J.-C. « Pharmacology of immunosuppression » in Golan D.E. *et al.*, *Principles of Pharmacology : The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2005 : 1-856.
- Dossiers techniques Certican®, Myfortic®, Rapamune®.

Achevé d'imprimer sur les presses de l'imprimerie Alfabase en novembre 2007
Dépôt légal : novembre 2007

Imprimé aux Pays-Bas

Infectiologie

Retrouvez dans ce tome 3 les disciplines suivantes :

- l'immunologie,
- la bactériologie,
- la virologie,
- la parasitologie,
- la mycologie,
- l'épidémiologie, la prévention et l'hygiène,
- les médicaments.

La collection du Moniteur Internat est devenue un outil de référence pour les pharmaciens et les biologistes, ainsi qu'une base de travail indispensable aux étudiants qui préparent le concours de l'Internat en pharmacie.

Rédigés par une équipe d'auteurs dirigée par Michel Vaubourdolle, biologiste à l'hôpital Saint-Antoine à Paris, les quatre tomes de la collection comportent les connaissances essentielles des disciplines pharmaceutiques et biologiques.

ISBN : 978-2-915585-40-7



www.WK-Pharma.fr

